

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**Producción de ocratoxina en las principales especies de  
"Aspergillus" sección circumdati : estudio de los genes  
implicados, métodos de detección y control**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Jéssica Gil Serna**

DIRECTORES:

**Belén, dir Patiño Álvarez**  
**Covadonga, dir Vázquez Estévez**

Madrid, 2015



502.20  
GIL  
pro

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN LAS PRINCIPALES  
ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI.  
ESTUDIO DE LOS GENES IMPLICADOS, MÉTODOS DE  
DETECCIÓN Y CONTROL

TESIS DOCTORAL



JÉSSICA GIL SERNA

MADRID, 2011

2011/11/13





**El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta.**

Charles Dickens (1812-1870), *escritor británico*.

**El arte es "yo", la ciencia es "nosotros".**

Charles Bernard (1813-1878), *fisiólogo francés*.



Dedicada a mi familia  
y a Matías



## AGRADECIMIENTOS

Madre mía cómo pasa el tiempo... Parece que fue ayer el día que subí tímidamente al Departamento buscando algún grupo que me permitiese colaborar con ellos... Y ahora, aquí estoy intentando recapitular a todos los que han colaborado para que este trabajo saliese adelante. Necesitaría otra tesis para poder agradecer correctamente a todos pero voy a hacer lo posible para resumir lo mejor que pueda.

Este trabajo no se podría haber llevado a cabo sin la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Universitario (FPU) y del proyecto otorgado al grupo de investigación (AGL 2007-66416-C05-02/ALI) así como la ayuda para la realización de mi estancia corta en el extranjero sin la cual esta tesis no podría haber optado a la mención de Doctorado Europeo. Muchísimas gracias a todo el Departamento de Microbiología III de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid por haberme permitido realizar allí esta tesis. Gracias a profesores, técnicos, secretario, becarios y demás colaboradores por facilitarme el trabajo en todo momento y aguantar mis defectos y manías. Además, tengo que agradecer al Departamento de Genética de la misma facultad el haberme acogido durante la realización de las obras que provocaron el cierre de nuestro Departamento y que coincidieron con el arranque de mi tesis.

Por supuesto, tengo que dar las gracias a mis dos directoras, la Dra. Belén Patiño y la Dra. Covadonga Vázquez por haberme permitido trabajar en el mejor laboratorio que alguien puede encontrar y por haber puesto tanto esfuerzo en que esto saliera bien. Belén, nunca he tenido tanta suerte que cuando te encontré en el pasillo cuando quería pedir mi beca de colaboración. Gracias por tu apoyo, tu dedicación y por estar ahí en todo momento cuando te necesitaba. Cova, muchísimas gracias por dar prioridad a esta tesis por encima de tus otras obligaciones, reuniones y "marrones varios", sobre todo en estos últimos meses donde no has tenido ni un minuto de tiempo libre. He aprendido mucho de todas tus estupendas ideas y reflexiones. Tengo que agradecer también a mi tercera "jefa" y corresponsable del grupo de investigación, María Teresa González-Jaén, que, aunque no figure en los papeles como directora, sus buenos consejos también han tenido una influencia enorme en todos estos años. Maite, muchísimas gracias por todas tus correcciones, sin tu ayuda no se habría publicado ningún resultado de esta tesis.

Muchas gracias al grupo de Jorge Muñoz del Laboratorio Arbitral Agroalimentario y, en especial a Laura Cortés y Guillermo Rodríguez, por la determinación de OTA por HPLC de todos los experimentos llevados a cabo. Además, quiero agradecer al Dr. Domingo Marquina y al Dr. Antonio Santos del Departamento de Microbiología III por suministrarme la toxina *killer* purificada de la levadura utilizada en algunos ensayos. Gracias a los Drs. Vicente Sanchis y Antonio Ramos del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida por todos los aislamientos que me han enviado. Muchas gracias a Rosa, secretaria de la facultad, por estar siempre dispuesta a facilitar los trámites y hacer que todo el horrible papeleo relativo a la tesis parezca fácil.

I am very grateful to Dr Rolf Geisen for allowing me to work in his lab in the Max Rubner Institute in Karlsruhe and for his help and direction during my stay in Germany. Thank you so much to Dr Markus Schmidt-Heydt for giving me advice in my experiments. And, of course, a big thanks to all the girls in the lab for teaching me and for their huge patience; Julia, Michaela, Nicole, Eva, Karla and Sheela, I am still waiting for your visit to Madrid!!

A todos los que han ido pasando por el labo 7 en este tiempo, por haber hecho que ir a trabajar no fuera duro. Ha sido un placer trabajar con todos vosotros. Muchas gracias a todas mis "pichurrinas". Amaia, gracias por tu actitud siempre positiva; iino sabes cómo se te echa de menos!! Noe, muchas gracias por preocuparte por mí y ser capaz de levantarme el ánimo hasta en el peor momento... Lo que unen los pimentones, ¿eh?. A Mirian, por ser tan buena profe en mis comienzos en el laboratorio. A Petra, por hacerme reflexionar sobre tantas cosas y por sus consejos siempre acertados. Muchas gracias a Miguel y Elena por su gran esfuerzo que tanto ha aportado al trabajo de los que hemos venido detrás. A nuestra reciente incorporada María, por facilitarme tanto las cosas y ser mi "mensajera especial" al CIB. Gracias a mis "pequeñitas", Rocío y Elisa, por ayudarme en mis experimentos en la recta final. Y a todos los que han pasado por "El 7" que, por supuesto, han influido en mí de una manera u otra: María, Marianna, Zuri, María, Pablo, Sara...

Gracias a todos los becarios (o simplemente "trabajadores sin retribución") del Departamento de Microbiología III con los que he tenido la suerte de coincidir en este tiempo. Gracias: Eva, Antonio, Paco, Ruth, Andrea, Mapi, Sara y Raquel por esas divertidas horas de comer en la biblioteca y por los buenos momentos de Congreso... ¿Nos volvemos a Almería?. Muchísimas gracias a Patri por estar siempre ahí para echarme una mano y por permitirme "robar" cosillas de su laboratorio en el Departamento de Genética. A Mónica por ser mi compañera de primeras horas de la mañana, ¡Mucho ánimo y ya verás como tu esfuerzo tiene compensación!.

A mis AMIGOS (pero con mayúsculas ¿eh?) por haberme acompañado desde el primer día de carrera, durante el desarrollo de la tesis y, espero que para siempre. Muchas gracias a Sara por sus palabras permanentes de ánimo y por no olvidarse de mí nunca (ni siquiera en mis momentos de "aislamiento pretesis"). A Álvaro por su apoyo, sus visitas y por aguantar todas mis aburridas conversaciones sobre ciencia, becas y demás papeleos. Muchas gracias a mis compañeros de fatigas y trabajos durante la carrera: Irene, María y Pablo porque sin su ayuda creo que todavía tendría enganchada alguna asignatura... ¡siempre nos quedará la gripe aviar!. A Alba, Yaz y Silvia por esas horas libres en la cafetería que tan bien nos venían para relajarnos... Y por supuesto, a todos los que vinieron con todos mis amigos de la carrera y que, simplemente, siempre están ahí para levantarme el ánimo cuando se los necesita: Alba, Alberto, Ángel, Diego, Santi...

Como ya ha quedado reflejado en las primeras hojas, esta tesis va dedicada especialmente a mi familia, pero sobre todo a mis padres por haber confiado en mí ciegamente en todas mis decisiones tanto académicas como personales y cuya educación e influencia me han hecho ser como soy. Gracias por enseñarme a no rendirme nunca y el esfuerzo que cuesta conseguir las cosas que se quieren.

Gracias a mi hermana Vanessa por estar siempre dispuesta a ayudar aunque no tenga prácticamente ni tiempo y por todos su regalitos de apoyo. Y a toda mi familia, abuela, tíos, tías y primitas por su preocupación e interés constante. ¡No hay otra familia como la mía!

Y por último, (aunque obviamente no menos importante) muchas gracias a Matias, simplemente por estar ahí en los buenos y malos momentos. Cuando llegaste coincidiendo con el principio de esta tesis nunca imaginé que lograras soportarme hasta el final. Gracias por tu apoyo constante y por todas las cosas estupendas que hemos vivido juntos.

¡Ah! Y no podía olvidarme de la "cosita" que más me ha acompañado durante la escritura de esta tesis. A mi gatita Pelusa, que no se ha separado de mi lado durante todas las interminables horas en el ordenador.





## INTRODUCCIÓN

13

<b>1. Micotoxinas .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Ocratoxina A .....</b>	<b>19</b>
2.1. Estructura y propiedades físico-químicas	19
2.2. Efectos tóxicos de la ocratoxina A	20
2.3. Presencia de ocratoxina A en productos alimentarios	21
2.4. Hongos productores de ocratoxina A	23
2.5. Biosíntesis de ocratoxina A	24
2.6. Legislación	28
<b>3. <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> .....</b>	<b>30</b>
3.1. Taxonomía de la sección <i>Circumdati</i>	30
3.2. Producción de micotoxinas por especies de la sección <i>Circumdati</i>	30
3.3. Presencia de especies de la sección <i>Circumdati</i> productoras de ocratoxina A en matrices alimentarias	32
3.4. Factores que determinan el crecimiento y la producción de ocratoxina A en las principales especies de la sección <i>Circumdati</i>	33
<b>4. Métodos de detección e identificación de hongos ocratoxígenos .....</b>	<b>34</b>
4.1. PCR convencional	35
4.2. PCR a tiempo real	37
4.3. <i>Microarrays</i>	40
<b>5. Prevención y control de la presencia de ocratoxina A en productos alimentarios .....</b>	<b>41</b>
5.1. Prevención de la producción de ocratoxina A por inhibición del crecimiento fúngico	41
5.1.1. Control de las condiciones de almacenamiento	42
5.1.2. Uso de agentes químicos o naturales	42
5.1.3. Control biológico con microorganismos antagónicos	43
5.2. Destoxificación de la ocratoxina A presente en los alimentos	44
5.2.1. Métodos físicos	45
5.1.2. Métodos biológicos	46
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>48</b>

## MATERIALES Y MÉTODOS

49

<b>1. Mantenimiento de cepas .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Obtención de suspensiones de esporas de hongos filamentosos y celulares de levaduras .....</b>	<b>51</b>
<b>3. Métodos moleculares basados en DNA para la detección de especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> .....</b>	<b>52</b>

3.1. PCR convencional	52
3.1.1. Extracción de DNA fúngico de cultivos puros	52
3.1.2. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	52
3.1.3. Electroforesis de DNA	52
3.1.4. Secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 y del gen <i>Btub</i>	53
3.1.5. Análisis filogenético	54
3.1.6. Diseño de cebadores específicos	54
3.1.7. Optimización de los ensayos de PCR específicos	55
3.1.8. Detección de las principales especies ocratoxígenas de la sección <i>Circumdati</i> en matrices alimentarias	57
3.2. PCR a tiempo real	57
3.2.1. Diseño de cebadores	57
3.2.2. Comprobación de la especificidad de los cebadores	58
3.2.3. Extracción de DNA genómico para PCR a tiempo real	58
3.2.4. Ensayos de PCR a tiempo real	59
3.2.5. Optimización del ensayo de PCR a tiempo real	60
3.2.6. Comprobación de la especificidad del ensayo	60
3.2.7. Estudio de la inhibición del ensayo por la presencia de DNA del hospedador	61
3.2.8. Detección de <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. ochraceus</i> en muestras artificialmente contaminadas	61
<b>4. Análisis de la producción de ocratoxina A en especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i></b>	<b>62</b>
4.1. Condiciones de cultivo	62
4.2. Extracción de ocratoxina A	62
4.3. Cuantificación de ocratoxina A	62
<b>5. Efecto de factores ecofisiológicos en el crecimiento, la producción de ocratoxina A y la esporulación en <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. steynii</i></b>	<b>63</b>
5.1. Condiciones de cultivo	63
5.2. Medida del crecimiento fúngico y producción de ocratoxina A	64
5.3. Esporulación	64
5.4. Análisis estadístico	64
<b>6. Estudio de los genes implicados en la síntesis de ocratoxina A en <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. steynii</i></b>	<b>65</b>
6.1. Ensayos de PCR convencional para el estudio de los genes <i>pks</i> y <i>p450-B03</i>	65
6.2. Análisis de la expresión de los genes <i>pks</i> , <i>p450-B03</i> , <i>aoks1</i> y <i>nrps</i> en <i>A. westerdijkiae</i>	65
6.2.1. Material biológico utilizado y condiciones de cultivo	65
6.2.2. Extracción de RNA	66
6.2.3. Síntesis de cDNA	66
6.2.4. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real	67
6.2.5. Análisis estadístico	68
6.3. Caracterización de genes implicados en la ruta de síntesis de ocratoxina A en <i>A. steynii</i>	68
6.3.1. Obtención de la secuencia completa de un gen que codifica para una citocromo p450 monooxigenasa implicada en la síntesis de ocratoxina A	68
6.3.1.1. Clonación de fragmentos amplificados por PCR	68
6.3.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico	69
6.3.1.3. 5'-RACE	69
6.3.1.4. Extracción y clonaje de bandas de DNA de geles de agarosa	71
6.3.2. Estudio de otros genes implicados en la síntesis de ocratoxina A en <i>A. steynii</i>	71

<b>7. Control biológico de <i>A. westerdijkiae</i> con levaduras. Estudio de <i>D. hansenii</i> CYC 1244 como un posible agente de biocontrol .....</b>	<b>72</b>
7.1. Selección de candidatos a agentes biocontrol frente a <i>A. westerdijkiae</i>	72
7.1.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad del posible agente biocontrol	74
7.1.2. Efecto de la salinidad sobre la actividad antagonista de <i>D. hansenii</i> CYC 1244	74
7.1.3. Análisis estadístico	74
7.2. Ensayos de biocontrol en uvas artificialmente contaminadas	75
7.3. Ensayos de actividad de la toxina <i>killer</i> de <i>D. hansenii</i> CYC 1244 frente a <i>A. westerdijkiae</i>	76
7.4. Estudio de los mecanismos implicados en la reducción de ocratoxina A por <i>D. hansenii</i> CYC 1244	76
7.4.1. Efecto sobre la expresión de genes implicados en la síntesis de ocratoxina A en <i>A. westerdijkiae</i>	76
7.4.2. Adsorción/absorción por <i>D. hansenii</i> CYC 1244	77
7.4.3. Degradación de ocratoxina A por <i>D. hansenii</i> CYC 1244	79
7.4.4. Análisis estadístico	79
 <b>RESULTADOS .....</b>	 <b>81</b>
<b>1. Análisis filogenético de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>2. Ensayos de PCR específicos para la discriminación de las principales especies ocratoxígenas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>3. Aplicación de los ensayos de PCR diseñados para la detección de <i>A. steynii</i>, <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. steynii</i> en matrices alimentarias .....</b>	<b>88</b>
3.1. Detección en muestras de pimentón	89
3.2. Detección en muestras de harina de cebada	91
<b>4. Ensayo de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. ochraceus</i> .....</b>	<b>93</b>
4.1. Comprobación de la especificidad de los cebadores mediante PCR convencional	93
4.2. Optimización del ensayo de PCR a tiempo real	93
4.3. Valoración del método de extracción de DNA	95
4.4. Comprobación de la especificidad del ensayo de PCR a tiempo real	95
4.5. Efecto de la presencia del DNA del hospedador	97
4.6. Detección de <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. ochraceus</i> en muestras artificialmente contaminadas	98
<b>5. Análisis de la producción de ocratoxina A en especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> .....</b>	<b>99</b>
<b>6. Influencia de la temperatura y la actividad de agua sobre el crecimiento y la producción de ocratoxina A en <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. steynii</i> .....</b>	<b>101</b>
6.1. Efecto de la temperatura y la actividad de agua sobre el crecimiento	101
6.2. Efecto de la temperatura y la actividad de agua sobre la producción de ocratoxina A	102

<b>7. Efecto del sustrato sobre el crecimiento, la producción de ocratoxina A y la esporulación de <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. steynii</i> en distintas condiciones de temperatura y actividad de agua .....</b>	<b>104</b>
7.1. Efecto del sustrato, la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento .....	104
7.2. Efecto del sustrato, la actividad de agua y la temperatura sobre la producción de ocratoxina A .....	108
7.3. Efecto del sustrato, la actividad de agua y la temperatura sobre la esporulación .....	111
<b>8. Estudio de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de ocratoxina A en <i>A. westerdijkiae</i> .....</b>	<b>113</b>
8.1. Caracterización del aislamiento utilizado en la descripción de los genes <i>pks</i> y <i>p450-B03</i> .....	113
8.2. Análisis de la expresión de los genes <i>pks</i> , <i>p450-B03</i> , <i>aoks1</i> y <i>nrps</i> en <i>A. westerdijkiae</i> .....	114
<b>9. Caracterización de genes implicados en la biosíntesis de ocratoxina A en <i>A. steynii</i> .....</b>	<b>116</b>
9.1. Caracterización de un gen que codifica para una citocromo p450 monooxigenasa .....	116
9.2. Caracterización de un gen que codifica para una cloroperoxidasa .....	120
9.3. Caracterización de genes que codifican para poliquétido sintasas .....	120
9.4. Análisis de la expresión de los genes candidatos mediante PCR a tiempo real .....	121
<b>10. Control biológico de <i>A. westerdijkiae</i> con levaduras. Estudio de <i>D. hansenii</i> CYC 1244 como un posible agente de biocontrol .....</b>	<b>124</b>
10.1. Selección de un posible agente de biocontrol frente a <i>A. westerdijkiae</i> .....	124
10.2. Efecto de la salinidad y la temperatura sobre la actividad antagonista de <i>D. hansenii</i> CYC 1244 frente a <i>A. westerdijkiae</i> .....	126
10.3. Ensayos de biocontrol en uvas artificialmente contaminadas .....	128
10.4. Efecto de la toxina <i>killer</i> de <i>D. hansenii</i> CYC 1244 sobre <i>A. westerdijkiae</i> .....	129
10.5. Mecanismos implicados en la reducción de la ocratoxina A producida por <i>A. westerdijkiae</i> debida a la presencia de <i>D. hansenii</i> CYC 1244 .....	129
10.5.1. Disminución en la producción de OTA por <i>A. westerdijkiae</i> .....	129
10.5.2. Adsorción a la pared y/o absorción al interior celular de la levadura .....	131
10.5.3. Degradación de ocratoxina A por <i>D. hansenii</i> CYC 1244 .....	133

---

## **DISCUSIÓN 135**

---

<b>1. Métodos moleculares para la detección de especies toxígenas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> .....</b>	<b>137</b>
1.1. Ensayos de PCR específicos para <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. ochraceus</i> y <i>A. steynii</i> .....	137
1.2. Ensayo de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. ochraceus</i> .....	139
<b>2. Incidencia de las principales especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> en harinas de cebada y pimentón.....</b>	<b>143</b>

2.1. Detección de <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. ochraceus</i> y <i>A. steynii</i> en harinas de cebada	143
2.2. Detección de <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. ochraceus</i> y <i>A. steynii</i> en pimentón	144
<b>3. Análisis de la producción de ocratoxina A en especies de <i>Aspergillus</i> sección Circumdati</b>	<b>146</b>
<b>4. Efecto de factores ecofisiológicos sobre el crecimiento, la producción de ocratoxina A y la esporulación en <i>A. westerdijkiae</i> y <i>A. steynii</i></b>	<b>147</b>
4.1. Estudio del efecto de la temperatura y la actividad de agua en medio sintético	148
4.2. Estudio de factores ecofisiológicos en medios basados en matrices alimentarias	149
<b>5. Análisis de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de ocratoxina A en <i>A. westerdijkiae</i></b>	<b>154</b>
<b>6. Aislamiento y caracterización de genes implicados en la ruta de síntesis de ocratoxina A en <i>A. steynii</i></b>	<b>156</b>
<b>7. Estudio de <i>D. hansenii</i> CYC 1244 para su aplicación como agente de biocontrol frente a <i>A. westerdijkiae</i></b>	<b>158</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>165</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>173</b>



<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
<b>a<sub>w</sub></b>	Actividad de agua
<b>BEN</b>	Nefropatía Endémica de los Balcanes
<b>CAST</b>	Consejo para la Ciencia y Tecnología Agrícola
<b>CBS</b>	Colección Holandesa de Cultivo de Hongos
<b>CCT</b>	Colección Brasileña de Cultivos Tropical
<b>cDNA</b>	DNA complementario del mRNA
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CPO</b>	Cloroperoxidasa
<b>C<sub>T</sub></b>	Ciclo umbral
<b>CYA</b>	Agar Czapek Extracto de levadura
<b>CYC</b>	Colección de Levaduras Complutense
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DON</b>	Deoxinivalenol
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EMBL</b>	Laboratorio Europeo de Biología Molecular
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación en el Cáncer
<b>IGS</b>	Espaciador Intergénico del rDNA
<b>IMI</b>	Colección de Recursos Genéticos de la CABI
<b>ITEM</b>	Colección de Cultivo del Instituto de Ciencias de la Producción Alimentaria
<b>ITS</b>	Espaciador Intergénico Tránsito del rDNA
<b>ISO</b>	Organización Internacional para la Estandarización
<b>JEFCA</b>	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<b>NRPS</b>	Sintetasa de Péptidos no Ribosomales
<b>NTC</b>	Control Negativo de PCR
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>OT-α</b>	Ocratoxina α
<b>OTB</b>	Ocratoxina B



<b>OT-β</b>	Ocratoxina β
<b>P450</b>	Citocromo p450 monooxigenasa
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDA</b>	Agar Dextrosa Patata
<b>PKS</b>	Poliquétido Sintasa
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>RASFF</b>	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos
<b>rDNA</b>	DNA ribosómico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>rRNA</b>	RNA ribosómico
<b>RT-PCR</b>	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa
<b>SCF</b>	Comité Científico de la Alimentación Humana
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de Fusión
<b>YMA</b>	<i>Yeast Morphology Agar</i>
<b>YMB</b>	<i>Yeast Morphology Broth</i>

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC.

Resumen



## **PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN LAS PRINCIPALES ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI. ESTUDIO DE LOS GENES IMPLICADOS, MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CONTROL**

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina ampliamente distribuida con propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, genotóxicas y teratogénicas y ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación en el Cáncer (IARC) como un posible carcinógeno en humanos. Actualmente, se conocen una gran variedad de sustratos susceptibles de ser contaminados por esta toxina como cereales y derivados, uvas y derivados, café, cacao y chocolate, frutos secos y especias, entre otros. Debido a su elevada incidencia y a los problemas que puede suponer para la salud humana y animal, los niveles máximos permitidos de OTA en una gran variedad de productos se encuentran regulados por la Unión Europea. La primera especie productora de OTA descrita fue *Aspergillus ochraceus* y, durante mucho tiempo, fue considerada la principal fuente de la toxina en productos alimentarios en climas cálidos. Esta especie se encuentra incluida dentro de la sección Circumdati, cuya taxonomía fue revisada recientemente, describiéndose nuevas especies con capacidad de producir OTA, entre las que se encuentran *A. westerdijkiae* y *A. steynii*. Hasta el momento, se han llevado a cabo muy pocos trabajos sobre estas importantes especies, por lo que esta investigación se centró en el estudio de su capacidad de producir OTA así como en el desarrollo de métodos para su detección y control.

La aplicación de técnicas moleculares para la discriminación de hongos toxígenos ha sustituido en gran medida a los métodos tradicionales ya que la diferenciación entre especies muy próximas filogenéticamente basada en caracteres morfológicos y culturales es muy compleja y requiere personal muy especializado. Por todo esto, se han desarrollado protocolos de PCR para la discriminación de las principales especies productoras de OTA de la sección Circumdati: *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus*. Los cebadores específicos se diseñaron a partir de alineamientos de la región ITS1-5,8S-ITS2 y su especificidad se probó utilizando DNA de una gran variedad de cepas fúngicas. Estas regiones hipervariables se encuentran en un elevado número de copias lo que aumenta considerablemente la sensibilidad del método. Se ha comprobado que esta herramienta puede ser muy útil para la discriminación de las principales especies productoras de OTA. Además, se ha puesto de manifiesto la necesidad de reclasificar los aislamientos de *A. ochraceus* identificados previamente a la descripción de las nuevas especies.

La detección temprana de especies productoras de OTA es imprescindible para evitar que la toxina entre en la cadena alimentaria. En este sentido, las técnicas moleculares ofrecen la ventaja de reducir considerablemente el tiempo del análisis con respecto a los laboriosos métodos tradicionales. Por tanto, los protocolos de PCR específicos diseñados para *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus* se aplicaron para la detección de estas especies en dos matrices alimentarias muestreadas según la normativa vigente. Las muestras de harina de cebada recogidas presentaron un mayor porcentaje de contaminación por las especies de estudio (53%) frente a las muestras de pimentón (18%). Mientras que *A. steynii* y *A. ochraceus* se detectaron en los dos sustratos, *A. westerdijkiae* sólo se encontró en muestras de pimentón.

Distintos autores han señalado que si los niveles de contaminación fúngica superan un determinado umbral en un alimento, probablemente, la concentración de OTA en el mismo exceda los límites legales. Por esto, se desarrolló un ensayo de PCR a tiempo real que permitiera cuantificar los niveles de *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* en dos matrices alimentarias frecuentemente contaminadas por ellas, uvas y café verde. El ensayo diseñado utiliza SYBR Green I como sistema de detección y está altamente optimizado para la detección de las dos especies. Además, este protocolo se aplicó para la detección de *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* directamente en uvas y café verde contaminados artificialmente. De esta manera, se comprobó que el método es aplicable para la cuantificación de estos hongos porque los niveles de detección eran proporcionales a la concentración de esporas utilizada en la inoculación y la señal se incrementaba según lo hacía el tiempo de incubación de las muestras.

Desde la descripción de nuevas especies incluidas en la sección *Circumdati*, varios autores han señalado que *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus* son las principales productoras de OTA pero no han precisado cuál es su capacidad relativa de producción. En este trabajo, se ha determinado su contribución al contenido de OTA en productos alimentarios. Los resultados indican que *A. ochraceus* no es la principal especie productora de la sección, como tradicionalmente se pensaba, ya que los niveles de OTA producidos eran muy bajos y únicamente un 14% de las cepas eran capaces de formar la toxina. Las especies más relevantes son *A. westerdijkiae*, con un 75% de cepas productoras y niveles de concentración de OTA 100 veces superiores a los de *A. ochraceus* y, principalmente, *A. steynii* con un 90% de cepas productoras y niveles 1000 veces superiores.

La temperatura, la actividad de agua ( $a_w$ ) y la composición del sustrato son tres de los factores más determinantes del crecimiento fúngico y de la producción

de micotoxinas. Los medios basados en matrices alimentarias nos dan una idea aproximada de cómo se comportarían los hongos desarrollándose en ese sustrato. Por esto, se determinó el efecto de la temperatura (20, 24 y 28 °C) y la  $a_w$  (0,92, 0,96, 0,99) sobre el crecimiento y la producción de OTA de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* en medios preparados a partir de extractos de pimentón, café verde, cebada, uvas, anís y maíz. Los resultados obtenidos muestran como las dos especies son capaces de crecer en las condiciones de temperatura y  $a_w$  ensayadas, no habiendo diferencia en los distintos sustratos. Sin embargo, el crecimiento aumentó significativamente con la temperatura y disminuyó al nivel más bajo de  $a_w$  tanto en *A. westerdijkiae* como en *A. steynii*. Además hay que destacar que, aunque los perfiles fueron similares en ambas especies, *A. westerdijkiae* alcanzó mayor crecimiento tras 10 días de incubación que *A. steynii* en todos los casos. La capacidad de producir OTA en las dos especies se vio afectada por los tres factores estudiados: temperatura,  $a_w$  y sustrato. En este caso, los resultados obtenidos fueron muy diferentes en las dos especies ya que *A. steynii* mostró una mayor capacidad de producción y en un rango más amplio de condiciones. De manera general, la producción de toxina aumentó a mayor temperatura y  $a_w$  en ambas especies, siendo en los medios preparados a base de cebada y pimentón donde se obtuvieron los niveles más altos de concentración de OTA. Únicamente *A. steynii* fue capaz de formar la toxina en el medio preparado a partir de uvas aunque en muy baja cantidad. Por tanto, la presencia de estas especies en alguna de estas matrices alimentarias debe tenerse muy en cuenta para evitar su contaminación con OTA.

El conocimiento de los genes implicados en la ruta de síntesis de OTA en el género *Aspergillus* es muy limitado. Por tanto, el siguiente objetivo se centró en la identificación y caracterización de genes implicados en la biosíntesis de OTA en *A. westerdijkiae* y *A. steynii*. En primer lugar, se demostró mediante ensayos específicos de PCR que los genes *pks* y *p450-B03* que habían sido descritos como implicados en la síntesis de OTA no se correspondían con *A. ochraceus* sino con *A. westerdijkiae*. Además se analizó la expresión de todos ellos mediante RT-PCR a tiempo real y se comprobó que los genes tenían perfiles de expresión semejantes a lo largo del tiempo en las cepas productoras de OTA. Asimismo, partiendo de una secuencia parcial del gen *p450-B03* de *A. westerdijkiae* y utilizando la técnica 5'-RACE, se caracterizó la secuencia completa de un gen *p450* en *A. steynii* de 1436 pb y con una identidad del 80% con el mencionado *p450-B03*. La expresión de este gen se analizó mediante RT-PCR a tiempo real y los resultados obtenidos mostraron que sí podría estar implicado en la biosíntesis de OTA. Las cepas que no pueden producir la toxina no expresaron el gen en ninguno de los casos, mientras que en

las cepas productoras sus niveles de transcripción fueron muy elevados y se relacionaban con la concentración de toxina extracelular.

Los fungicidas químicos son, hasta el momento, el método más utilizado para el control del crecimiento fúngico. Sin embargo, los problemas que puede suponer su uso tanto para la salud humana como para el medio ambiente, han provocado la búsqueda de nuevos métodos de control. El control biológico utilizando microorganismos antagónicos ha sido propuesto como una buena alternativa a estos productos químicos; entre los posibles agentes, este trabajo se centró en la selección de una cepa de levadura antagonista frente a *A. westerdijkiae*. Los mejores resultados se obtuvieron con *Debaryomyces hansenii* CYC 1244 que fue capaz no sólo de reducir el crecimiento del hongo en un variado rango de condiciones, sino también de disminuir la concentración de OTA en medio CYA hasta niveles por debajo de los detectables. Una vez seleccionada la cepa CYC 1244 de *D. hansenii*, se estudiaron los mecanismos implicados en la reducción de la OTA extracelular producida por *A. westerdijkiae* debida a la presencia de la levadura. De los mecanismos estudiados: reducción de la síntesis de toxina por parte del hongo, adsorción a la pared de la levadura, absorción al interior celular o degradación de la OTA producida, dos de ellos se mostraron como los más probablemente implicados. Por un lado, *A. westerdijkiae* disminuyó la producción de toxina ya que los genes implicados en la producción de OTA, *pks* y *p450-B03*, se expresaban a niveles mucho menores cuando estaba presente la levadura. Por otro lado, *D. hansenii* CYC 1244 fue capaz de adsorber la toxina a su pared celular y eliminar la OTA de los extractos incluso cuando las células no eran viables.

Por tanto, en esta tesis se han desarrollado protocolos moleculares para un diagnóstico rápido y específico de las principales especies de *Aspergillus* sección Circumdati productoras de OTA, que pueden ser aplicados para su detección directamente en matrices alimentarias. Además se ha dilucidado la capacidad productora de OTA de estas especies, demostrando la importancia de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* debido a que pueden producir mayores niveles de toxina y en unas condiciones muy amplias. Asimismo, se han caracterizado distintos genes implicados en la síntesis de OTA. Por último, se ha desarrollado un novedoso método para el control de *A. westerdijkiae* y se ha visto que *D. hansenii* CYC 1244 podría ser utilizada también para la destoxificación de los alimentos debido a su capacidad de adsorber la OTA a su pared.

**Abstract**





## **OCHRATOXIN A PRODUCTION BY THE MAIN SPECIES OF *Aspergillus***

### **SECTION CIRCUMDATI. STUDY OF BIOSYNTHETIC GENES, DETECTION AND CONTROL METHODS.**

Ochratoxin A (OTA) is a widespread mycotoxin with nephrotoxic, immunotoxic, genotoxic and teratogenic properties and it has been classified as a possible human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC). Different substrates are susceptible to OTA contamination such as cereals and cereal products, grapes and derivatives, coffee, cocoa and chocolate, nuts and spices, among others. Due to its high incidence and its toxic properties towards both humans and animals, the maximum OTA levels in a variety of products are regulated by the European Union. The first OTA-producing species described was *Aspergillus ochraceus* and, for a long time, it was considered as the main source of OTA contamination in warm climates. This species is included in section Circumdati, whose taxonomy has been recently revised and new species capable of producing OTA have been described, including *A. westerdijkiae* and *A. steynii*. There are few published works about these important species so far; therefore this research was focused on the study of their ability to produce OTA and the development of detection and control methods.

The use of molecular techniques to identify toxigenic fungi is replacing traditional methods because the discrimination of phylogenetically closely related species based on morphological and cultural characters is often very complex and requires expert taxonomists. Hence, we have developed specific PCR protocols for the discrimination of the main OTA-producing species included in section Circumdati: *A. westerdijkiae*, *A. steynii* and *A. ochraceus*. Specific primer sets were designed on the basis of sequence alignments of the ITS1-5.8S-ITS2 region. Their specificity was tested using genomic DNA from a wide number of fungal strains. The use of these multicopy and hypervariable regions increased the sensitivity of the assay. In this work, we have proven that reclassification of *A. ochraceus* isolates identified before the description of the new species is required.

Early detection of OTA-producing species is essential to prevent that the toxin enters the food chain. Molecular techniques provide an advantage in order to reduce the time of analysis compared to traditional methods. Therefore, the specific PCR protocols for *A. westerdijkiae*, *A. steynii* and *A. ochraceus* were applied to detect these species in two food matrices sampled according to current regulations. The barley flour samples analyzed showed a higher percentage of contamination by these species (53%) compared to paprika samples (18%). Whereas *A. steynii* and

*A. ochraceus* were found in both substrates, *A. westerdijkiae* was only detected on paprika samples. These results suggest a risk of OTA contamination in these matrices.

Several authors have pointed out that if fungal contamination exceeds certain levels in one product, the concentration of OTA probably will be above the legal limits. Therefore, we developed a real time PCR assay that allows the quantification of *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* in two food matrices, grapes and green coffee beans. This assay was based on SYBR Green I chemistry and it was highly optimized for the detection of both species. The protocol was directly applied for *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* detection in artificially contaminated grapes and green coffee beans. Moreover, this method could be applicable for fungal quantification since the detection levels were proportional to the spore concentration used in the inoculation and the signal was increased with the incubation time of samples.

Since the description of new species in *Aspergillus* section *Circumdati*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii* and *A. ochraceus* were considered the main OTA producers although their production ability has not been previously demonstrated. In this work, the relative contribution of these species to OTA risk in food products has been established. The results indicated that *A. ochraceus* was not the main producer of the section, as traditionally believed, since the levels of OTA produced were very low and only 14% of the strains were OTA producers. The most important species were *A. westerdijkiae*, with 75% of producing strains and OTA concentration levels 100 times higher than those produced by *A. ochraceus*, and, specially, *A. steynii* with 90% of OTA-producing strains and levels up to 1000 times higher.

Temperature, water activity ( $a_w$ ) and substrate are three of the most important factors affecting fungal growth and mycotoxin production. Matrix-based media were used as a good approximation to the behavior of fungi growing on that substrate. We determined the effects of temperature (20, 24 and 28 °C) and  $a_w$  (0.92, 0.96, 0.99) on growth and OTA production by *A. westerdijkiae* and *A. steynii* in media prepared with extracts of paprika, green coffee, barley, grapes, anise and corn. Both species were able to grow at all temperatures and  $a_w$  tested and the substrate did not affect fungal growth. However, growth increased significantly with temperature and decreased at the lowest  $a_w$  tested in *A. westerdijkiae* and *A. steynii*. Growth profiles were similar in both species although the highest growth was found in *A. westerdijkiae* after 10 days of incubation in all conditions. The ability to produce OTA in both species was affected by the three factors studied: temperature,  $a_w$  and substrate. In this case, the results were markedly different in

both species since *A. steynii* showed higher production ability and in a wider set of conditions than *A. westerdijkiae*. In general, toxin production was increased at higher temperature and  $a_w$  in both species. The highest levels of OTA concentration were obtained in barley and paprika-based media. Only *A. steynii* was able to produce OTA in grape-based medium but at very low levels. Therefore, the prediction of OTA risk might differ depending on the substrate considered when contamination of *A. westerdijkiae* and *A. steynii* is detected.

The information about the genes involved in the OTA biosynthetic pathway in the genus *Aspergillus* is still scarce. Therefore, the following objective was to identify and to characterize genes involved in toxin biosynthesis in *A. westerdijkiae* and *A. steynii*. First of all, we demonstrated, using specific PCR assays for *pks* and *p450-B03* genes, that the species where these two genes had been previously described was in fact *A. westerdijkiae* instead of *A. ochraceus*. The expression of these genes was analyzed by real time RT-PCR and the results showed that they had similar expression patterns in OTA-producing *A. westerdijkiae* strains throughout the time. Moreover, a complete sequence of a *p450* gene in *A. steynii* has been characterized using 5'-RACE technique. The sequence had 1436 bp and presented an 80% of identity with the *p450-B03* gene of *A. westerdijkiae*. Parallely, OTA production and expression of this *p450* gene by real time RT-PCR were examined. The results indicated that this gene might be actually involved in OTA biosynthesis in *A. steynii*.

Currently, chemical fungicides are the most widely used method for controlling fungal growth. However, fungicides are known to be harmful to human health and environment. Biological control using antagonistic microorganisms might be a good alternative to chemicals. The next objective was focused on the selection of yeast strains with antagonistic properties towards *A. westerdijkiae*. The best results were obtained with *Debaryomyces hansenii* CYC 1244, which was able to reduce fungal growth in a wide range of conditions, and OTA concentration in CYA medium.

Once *D. hansenii* CYC 1244 was selected, the mechanisms involved in the reduction of extracellular OTA produced by *A. westerdijkiae* due to the presence of the yeast were examined. Reduction of OTA biosynthesis and adsorption to yeast cell wall were shown to be the most likely mechanisms involved in the decrease of OTA extracellular content. The contribution of absorption into the cell and degradation mechanisms was discarded. On one hand, the effects on OTA biosynthesis were deduced from the analysis of *pks* and *p450-B03* expression by real time RT-PCR. On the other hand, *D. hansenii* CYC 1244 was able to adsorb OTA

to its cell wall removing it from the extracellular extracts even when cells were not viable.

In conclusion, in this thesis we have developed molecular protocols for rapid and specific diagnosis of the main OTA-producing species included in *Aspergillus* section Circumdati, which can be applied directly to fungal detection in food products. The ability of these species to produce OTA was also elucidated being *A. westerdijkiae* and *A. steynii* probably the most important species since they produce higher levels of toxin in a wide set of conditions. Additionally, several genes involved in OTA biosynthesis were characterized in *A. westerdijkiae* and *A. steynii*. Finally, we developed a novel method to control *A. westerdijkiae* by the yeast *D. hansenii* CYC 1244. This strain might also be used to develop detoxification protocols in food on the basis of its cell wall ability to adsorb OTA.

# Introducción



## **1. MICOTOXINAS**

La definición del término micotoxina más aceptada actualmente es la aportada por Pitt (1996) según la cual "las micotoxinas son metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales (sin excluir aves) y personas". La exposición de cualquier tipo a estos metabolitos tóxicos causa las enfermedades denominadas micotoxicosis (Bennett & Klich, 2003).

Los efectos producidos por las micotoxinas en la salud humana o animal se pueden dividir en agudos, debidos a la ingestión de altos niveles de micotoxinas, y crónicos, producidos por la exposición a estos compuestos en bajas dosis durante largos periodos de tiempo (Bennett & Klich, 2003; Bryden, 2007). La intoxicación aguda con micotoxinas se asocia principalmente con síntomas gastrointestinales aunque en algunos casos también se ha relacionado con pérdida de sensibilidad en la piel o con la aparición de problemas neurológicos, llegando incluso a la muerte debida a fallos orgánicos (Pitt, 2000a). Las afecciones agudas son un problema importante en países en vías de desarrollo donde las malas condiciones higiénicas y las características climáticas favorables para el desarrollo fúngico suponen una acumulación muy alta de micotoxinas en los alimentos (Wagacha & Muthomi, 2008). En las últimas décadas, se han producido distintos brotes de micotoxicosis aguda con elevada incidencia que supusieron la muerte de cientos de personas en África (Peraica *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2005). En el caso de los países desarrollados, el mayor impacto en la salud debido a estos compuestos se debe a las intoxicaciones crónicas (Bryden, 2007). Se han observado diferentes efectos crónicos en animales y humanos asociados a las propiedades carcinógenas, teratogénicas, mutagénicas e inmunosupresoras de las micotoxinas, así como defectos en el crecimiento y el desarrollo en niños. Sin embargo, es muy difícil la confirmación diagnóstica de que una patología se debe realmente a una micotoxicosis debido a que es necesaria la detección de la toxina en el alimento del que se ha ingerido y, normalmente, la fuente alimentaria no está disponible cuando el problema se reconoce definitivamente (Casteel & Braun, 1992).

Hay indicios de que las micotoxinas han afectado al hombre desde el momento en el que empezó a cultivar productos de manera controlada. Marr & Maloy (1996) sugieren que una de las diez plagas que afectaron a Egipto relatadas en la Biblia fueron debidas a una intoxicación por tricotecenos que contaminaban los cereales de los que se alimentaban los primogénitos.



Sin duda, la micotoxicosis que ha producido mayor número de hechos resonantes en la historia ha sido el ergotismo, producido por la formación de alcaloides ergóticos por el hongo *Claviceps purpurea* y asociada al consumo de centeno (Christensen, 1970). Existen documentos en las civilizaciones asiria, persa y romana en los que se describen tanto las lesiones que produce el hongo al crecer sobre el cereal como los efectos que su ingestión acarrea tanto en seres humanos como en animales (Soriano, 2007). El ergotismo fue el causante de la enfermedad denominada "Fuego de San Antonio" que afectó a gran parte de la población europea en la Edad Media. La patología se denominó así debido a la alternancia de una sensación de frío intenso con una gran quemazón en las extremidades que culminaba en la necrosis y gangrena de las mismas (Beardall & Miller, 1994). El famoso caso de las brujas de Salem que se dio en Massachussets en el año 1692 también fue debido a la ingestión de las micotoxinas de *C. purpurea* concretamente de la dietilamida del ácido lisérgico (LSD). Este compuesto es un potente alucinógeno y provocó que varias decenas de personas fueran ahorcadas al confundir sus síntomas con comportamientos propios de hechiceros (Soriano, 2007).

En los primeros años de la segunda guerra mundial, cientos de personas murieron por una afección del sistema nervioso central. Esta enfermedad, denominada Aleukia Tóxica Alimentaria, se achacó al consumo de cereales contaminados por hongos y, en estudios posteriores, se demostró que se debía a la presencia de tricotecenos producidos por *Fusarium sporotrichioides* en los granos (Richard, 2007).

A pesar de todos estos acontecimientos, el interés por las micotoxinas y las micotoxicosis no sería importante hasta la década de los 60 cuando se produjo la muerte de más de cien mil pavos en distintas granjas en Inglaterra. El estudio de esta enfermedad llevó a la identificación de las aflatoxinas como agente causal de la misma (Asao *et al.*, 1963) y, posteriormente, a la confirmación de sus efectos cancerígenos (Dickens & Jones, 1963).

No existe un consenso entre los investigadores sobre como clasificar las micotoxinas y existen distintos criterios que dependen de la formación de la persona que hace la categorización (Bennet & Klich, 2003). De esta manera tenemos, entre otras, clasificaciones basadas en los hongos que las producen, su estructura química, el órgano al que afectan o los efectos tóxicos que producen sobre las células.

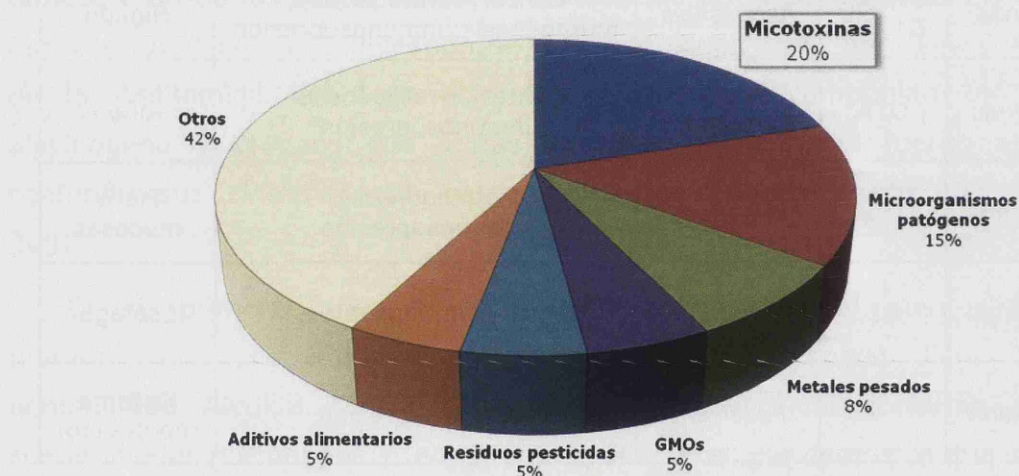
Las principales especies micotoxígenas se agrupan dentro de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Creppy, 2002). A pesar de que se han caracterizado más de 300 micotoxinas, los investigadores han centrado sus estudios en aquellas que afectan a la salud humana o al ganado. Por tanto, actualmente las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas y zearalenona son consideradas las principales micotoxinas (Hussein & Brasel, 2001). En la tabla 1.1, se muestran los principales tipos de toxinas, los productores más importantes, así como las características toxicológicas de las mismas.

Micotoxina	Tipos	Productor	Efectos crónicos	Órgano
Aflatoxinas	B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus</i>	Cáncer, teratogénesis, mutagénesis, inmunosupresión	Hígado
Ocratoxinas	OTA	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Cáncer, teratogénesis, inmunosupresión	Riñón
Tricotecenos	DON, T-2	<i>Fusarium</i>	Teratogénesis, inmunosupresión	Piel y mucosas
Fumonisin	B1	<i>Fusarium</i>	Cáncer, inmunosupresión	Esófago
Zearalenona	-	<i>Fusarium</i>	Inmunosupresión	Sistema reproductor

**Tabla 1.1.** Principales micotoxinas. Se muestran los principales tipos de cada una de ellas, en qué género se encuentran las principales especies productoras, así como los efectos crónicos que producen y el principal órgano al que afectan. DON: Deoxinivalenol, OTA: ocratoxina A, T-2: Toxina T-2 (Bryden, 2007).

El Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) se creó en el año 1979, pero no fue hasta 2002 con la aprobación de la Ley General de Alimentos (Comisión Europea, 2002a) cuando alcanzó una gran importancia en el contexto europeo gracias a la creación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). El RASFF permite el contacto entre los más de treinta países europeos participantes, de manera que todos puedan reaccionar con rapidez ante una alerta alimentaria notificada por alguna de las autoridades de la Unión Europea. La información transmitida a través de esta red comprende distintos niveles: notificaciones de alertas cuando es necesario tomar acciones inmediatas debido a que el producto está en el mercado y notificaciones de información cuando el producto no está aún en el mercado. Recientemente, se ha publicado el último informe anual del RASFF correspondiente a 2009 (RASFF, 2010) en el que se puede

comprobar que las micotoxinas supusieron el mayor número de alertas alimentarias que se distribuyeron a través de los países que constituyen la red (figura 1.1). En este informe se señala que las 665 alertas alimentarias debido a la contaminación de alimentos por micotoxinas estuvieron debidas únicamente a cuatro tipos de ellas: aflatoxinas, OTA, DON y fumonisinas. Además, la información relativa a los productos que no entran en la Unión Europea al ser rechazados en los controles fronterizos también es distribuida por el RASFF a todos los integrantes de la red. En el último informe anual publicado (RASFF, 2010) se adjudica un 36% de estos rechazos a niveles de contaminación por micotoxinas que superan los límites legales en los alimentos.



**Figura 1.1.** Distribución de las notificaciones de alertas alimentarias que se distribuyeron a través del RASFF en el año 2009 (RASFF, 2010). En la sección OTROS del diagrama se agrupan 18 clases de notificaciones diferentes, ninguna de las cuales supera el 4,5% del total.

Se han realizado numerosos estudios que demuestran que las micotoxinas suponen significativas pérdidas económicas y un importante riesgo para la salud humana y animal no sólo en países en vías de desarrollo, sino también en los países desarrollados (Zain, 2010). Se estima que entre el 25 y el 50 % de los cultivos mundiales están contaminados con micotoxinas (Dohlman, 2003) y que únicamente en EEUU las pérdidas asociadas a la presencia de éstas ascienden a más de mil millones de dólares cada año (CAST, 2003).

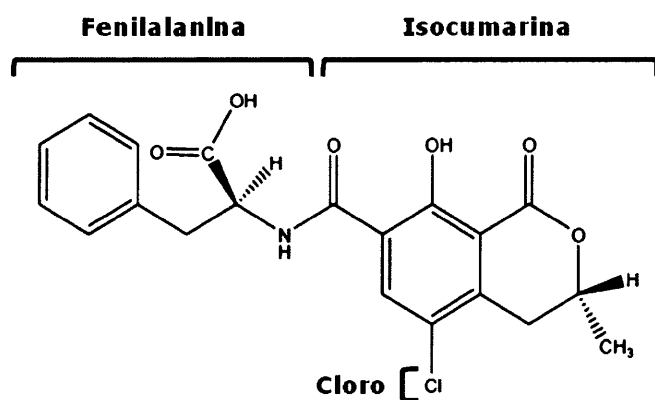
Por todo esto, actualmente más de cien países distribuidos por todo el mundo han regulado los niveles máximos de micotoxinas que se pueden encontrar en una gran variedad de productos destinados al consumo (Van Egmond *et al.*, 2007). Con

el fin de reducir los niveles de micotoxinas en la cadena alimentaria, la Unión Europea había legislado los niveles máximos de algunas de ellas pero de una forma poco restrictiva y bastante dispersa (Comisión europea, 2001; Comisión Europea, 2002b; Comisión Europea, 2004; Comisión Europea, 2005a). Sin embargo, en 2006 restringió de manera importante y en un único reglamento los niveles máximos de micotoxinas en los alimentos destinados al consumo humano (Comisión Europea, 2006b). Posteriormente, el aumento de los estudios sobre micotoxinas y la incorporación de nuevos países a la Unión Europea, han hecho que la Comisión haya aumentado el rango de productos donde se aplica la legislación y variado los niveles máximos permitidos (Comisión Europea, 2007; Comisión Europea, 2010a; Comisión Europea, 2010b). Por otro lado, la Unión Europea también ha regulado los métodos de muestreo y los protocolos que deben aplicarse para el análisis de micotoxinas en alimentos (Comisión Europea, 2006a; Comisión Europea, 2010c).

## 2. OCRATOXINA A

### 2.1.- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, la ocratoxina A (OTA) es un pentaquétido cíclico compuesto por una porción de dihidroisocumarina clorada ligada a una  $\beta$ -fenilalanina (IUPAC, 1992). Su estructura química se muestra en la figura 1.2. La ocratoxina B (OTB) es el derivado no clorado de la OTA (Steyn, 1995) y, a pesar de su similitud estructural, posee una toxicidad significativamente menor (Mally *et al.*, 2005).



**Figura 1.2.** Estructura química de la ocratoxina A. En el esquema se indica la posición de las partes principales de la molécula.

Las enzimas de la familia de las carboxipeptidasas son capaces de degradar la OTA liberando fenilalanina y un derivado dihidroisocumarínico no tóxico denominado ocratoxina- $\alpha$  (OT- $\alpha$ ) (Pitout & Nel, 1969; Bruinink *et al.*, 1998). Estas enzimas son producidas por la mayor parte de los microorganismos que se encuentran en el estómago de los rumiantes, por lo que los efectos tóxicos de la OTA en estos animales se han descrito muy raramente (Marquardt & Frohlich, 1992; Battacone *et al.*, 2010).

La OTA es una molécula muy estable y puede resistir los tratamientos a altas temperaturas. Se ha visto que esta toxina no se degrada a las condiciones normales utilizadas en la pasteurización, e incluso con tratamientos a 250 °C la eliminación de la toxina no es completa (Boudra *et al.*, 1995). Esto hace que una vez que la OTA entra en la cadena alimentaria sea muy difícil de eliminar.

## **2.2.- EFECTOS TÓXICOS DE LA OCRATOXINA A**

El principal órgano diana de la OTA en los mamíferos es el riñón ya que es capaz de afectar a sus células al inducir un defecto en el transporte de aniones (Steyn, 1995). Esta toxina parece ser el agente causal de una enfermedad renal que ha ocurrido desde hace más de medio siglo en regiones rurales de Bulgaria, la antigua Yugoslavia y Rumanía, que se conoce con el nombre de Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN) (Stoev, 1998). Esta patología suele conllevar al fallo renal y está asociada al desarrollo de tumores del tracto urinario en los pacientes que la sufren (Tatu *et al.*, 1998; Ignjatovic *et al.*, 2004). A pesar de que algunos autores aún piensan que la OTA no está implicada en la BEN, es un hecho que prácticamente todas las personas afectadas presentan elevados niveles de toxina tanto en sangre como en orina (Castegnaro *et al.*, 2006). Otra evidencia de que no hay otros implicados en el desarrollo de la BEN es la similitud en los síntomas de esta patología con la nefropatía porcina inducida por OTA que se ha encontrado en diversos países europeos (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Además, estudios recientes demuestran que la OTA parece ser la principal causa de la nefropatía intersticial crónica que afecta a gran parte de la población de Túnez y que tiene unos síntomas similares a la BEN (Hassen *et al.*, 2004; Zaied *et al.*, 2010).

Los efectos carcinógenos de la OTA han sido ampliamente probados en animales de experimentación (Huff, 1991; Boorman *et al.*, 1992; Rached *et al.*, 2007). Distintos estudios han asociado la OTA no sólo con tumores renales sino también de glándula mamaria, hígado y testículos (Clark & Snedeker, 2006). En 1993, la

Agencia Internacional de Investigación en el Cáncer (IARC) realizó un estudio exhaustivo donde recogió todas las evidencias experimentales sobre las propiedades toxicológicas de la OTA y la clasificó como un posible carcinógeno en humanos (grupo 2B) (IARC, 1993).

La OTA también puede afectar al sistema inmune al deprimir las defensas naturales incluso a muy bajas dosis (Petzinger & Weindenbach, 2002). Por otro lado, la toxina presenta importantes efectos teratogénicos (Brown *et al.*, 1976); puede atravesar la placenta y causar anomalías morfológicas y defectos en el sistema nervioso central del feto (El Khoury & Atoui, 2010).

Los mecanismos de toxicidad celular de la OTA parecen deberse principalmente a la presencia en la molécula de un grupo lactona que, al ser estructuralmente análogo a los sitios activos de algunas enzimas mitocondriales, es capaz de competir con ellas por el sustrato (Xiao *et al.*, 1996). Por otro lado, la OTA es capaz de inhibir específicamente la síntesis de proteínas al afectar a la formación del aminoácido fenilalanina (Dirheimer & Creppy, 1991). La OTA tiene además efectos tóxicos específicos en distintas células de mamíferos, destacando la capacidad de la toxina para inducir la apoptosis en células renales mediante distintas vías (Hussein & Brasel, 2001). Otros mecanismos de toxicidad celular asociados a esta toxina son las alteraciones en las señales de transducción y la inducción de estrés oxidativo (Schilter *et al.*, 2005).

### **2.3.- PRESENCIA DE OCRATOXINA A EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS**

La OTA es considerada una micotoxina de distribución mundial (Speijers & Van Egmond, 1993). La primera vez que se detectó como un contaminante natural fue en una muestra de maíz a finales de los años 60 (Shotwell *et al.*, 1969). A partir de ese momento, la presencia de la toxina se ha descrito también en otros cereales como cebada, trigo, sorgo, centeno, avena y arroz (Baliukoniene *et al.*, 2003; Riba *et al.*, 2008; Zaid *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010b) y en los productos derivados de los mismos como pueden ser harinas, pan, cereales para el desayuno o cerveza, entre otros (Biffi *et al.*, 2004; Araguás *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2007; Zinedine *et al.*, 2007; Kabak, 2009; Villa & Markaki, 2009).

Después de los cereales, el vino es considerado la mayor fuente de OTA de la dieta humana (Comisión Codex Alimentarius, 1999). Desde que en 1996 se detectara por primera vez la OTA en vinos (Zimmerli & Dick, 1996), se han llevado a cabo una gran variedad de estudios por todo el mundo que han demostrado también la presencia de la toxina en uvas y sus derivados, incluyendo mostos,

zumos, vinagre y pasas (Battilani & Pietri, 2002; Battilani *et al.*, 2006b; Chulze *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2006; Varga & Kozakiewicz, 2006; Lasram *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2010). Además, se ha comprobado que el tipo de vino así como la localización geográfica donde se produce, determinan de forma importante la concentración de OTA que contienen (Battilani *et al.*, 2006b; Mateo *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2008).

Otro de los sustratos dónde más comúnmente se ha detectado la OTA es el café (Studer-Rohr *et al.*, 1995; Romani *et al.*, 2000; De Almeida *et al.*, 2007; Coronel *et al.*, 2011). Los derivados cárnicos, así como la leche y los productos lácteos también pueden estar contaminados con OTA (Skaug, 1999; Pietri *et al.*, 2006; Boudra *et al.*, 2007; Dall'Asta *et al.*, 2008; Bailly & Guerre, 2009). La presencia de la toxina en productos cárnicos y lácteos se debe, en gran medida, a la alimentación de los animales con piensos producidos con materias primas contaminadas (Dall'Asta *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009).

Cada vez se conocen más sustratos susceptibles de ser contaminados por esta toxina debido al aumento de los estudios de incidencia de OTA. Actualmente, otras importantes fuentes de la toxina en la dieta humana son las frutas y frutos secos (Iamanaka *et al.*, 2005; Magnoli *et al.*, 2007b; Bircan, 2009; Bouaziz *et al.*, 2010; Zinedine, 2010), cacao y chocolate (Serra, 2004; Tafuri *et al.*, 2004; Copetti *et al.*, 2010) o especias (Thirumala-Devi *et al.*, 2001; Fazekas *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008). Además, dependiendo de los hábitos alimentarios que se tengan en distintas regiones geográficas, la OTA puede suponer un elevado riesgo en alimentos donde se ha detectado en pocas ocasiones hasta el momento (Duarte *et al.*, 2009). Entre estas matrices alimentarias se encuentran las hierbas medicinales y aromáticas (Santos *et al.*, 2009; Espejo *et al.*, 2010), regaliz (Ariño *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2009; Pietri *et al.*, 2010) o aceite de oliva y aceitunas (Papachristou & Markaki, 2004; El Adlouni *et al.*, 2006; Ferracane *et al.*, 2007).

Distintas organizaciones internacionales, han evaluado la ingesta diaria de OTA en los ciudadanos de los distintos países europeos. En 2002, se publicó el resultado de un proyecto SCOOP (Cooperación Científica en Temas relativos a los Alimentos) en el cual se tenía en cuenta tanto la incidencia de OTA en los distintos alimentos como la cantidad de cada uno de ellos que los consumidores tomaban diariamente (Miraglia & Brera, 2002). En este informe se señalaban los cereales como la principal fuente de OTA en la ingesta humana en once de los países estudiados, mientras que en los otros dos la mayor ingesta de la toxina se debía al consumo de vino. Posteriormente, la Comisión Europea consultó a la EFSA sobre los riesgos para

la seguridad alimentaria que podía suponer el consumo de OTA y, en el informe final de los expertos, se reafirma la idea de que la principal fuente de OTA en la dieta en la población adulta europea son los cereales (EFSA, 2006).

La ingesta semanal tolerable de OTA fue establecida en 100 ng/kg de peso corporal por el Comité mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JEFCA) (JEFCA, 2001). Sin embargo, otras organizaciones internacionales han disminuido los niveles diarios de OTA que se puede consumir sin poner en peligro la salud humana (Walker & Larsen, 2005).

#### 2.4.- HONGOS PRODUCTORES DE OCRATOXINA A

Actualmente, se conocen una gran variedad de especies incluidas en los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que pueden formar OTA (Varga *et al.*, 2001; Barlow *et al.*, 2008; El Khoury & Atoui, 2010) aunque las condiciones óptimas de producción en cada una de ellas son muy diferentes (EFSA, 2006). La primera vez que se aisló la toxina fue a partir de un cultivo de una cepa de *A. ochraceus* aislada de cereales en Sudáfrica (Van der Merwe *et al.*, 1965), especie por la cual tomo el nombre de ocratoxina. Durante mucho tiempo se consideró *A. ochraceus* como la principal especie productora de OTA en zonas con climas cálidos o templados (Pitt, 2000b). Frisvad *et al.* (2004) revisaron la taxonomía de la sección *Circumdati*, donde se incluye *A. ochraceus*, y describieron nuevas especies, algunas de las cuales eran capaces de producir OTA, como *A. westerdijkiae* y *A. steynii*. En la bibliografía se pueden encontrar numerosos trabajos que demuestran la capacidad de producir OTA de otras especies de la sección como *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. petrakii* o *A. elegans*, entre otros (Varga *et al.*, 1996; Bayman *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2003). Sin embargo, los cambios en la clasificación y los problemas que supone la correcta identificación de los aislamientos de matrices alimentarias, hacen dudar de la capacidad toxígena de estas especies (Frisvad *et al.*, 2006).

Otras importantes especies de *Aspergillus* productoras de OTA se encuentran clasificadas dentro de la sección *Nigri* (Varga *et al.*, 2001). Actualmente, se considera a *A. carbonarius* como el principal productor de OTA del grupo de los hongos negros debido a que todas las cepas son productoras y a su alta incidencia en uvas y vinos, fundamentalmente en la región Mediterránea (Cabañes *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2003; Belli *et al.*, 2005; Battilani *et al.*, 2006a; Belli *et al.*, 2006). Las especies del agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*) también contribuyen de manera importante a la contaminación por OTA en alimentos ya que,



aunque hay un escaso porcentaje de cepas productoras, son las especies contaminantes más comunes en algunas matrices como las uvas (Chulze *et al.*, 2006; Guzev *et al.*, 2006; Hocking *et al.*, 2007). Existen otras especies incluidas en la sección Nigri que podrían producir OTA como *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger* y *A. japonicus*, pero sobre este hecho no existe un consenso entre los investigadores (Dalcero *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2004; Visconti *et al.*, 2008).

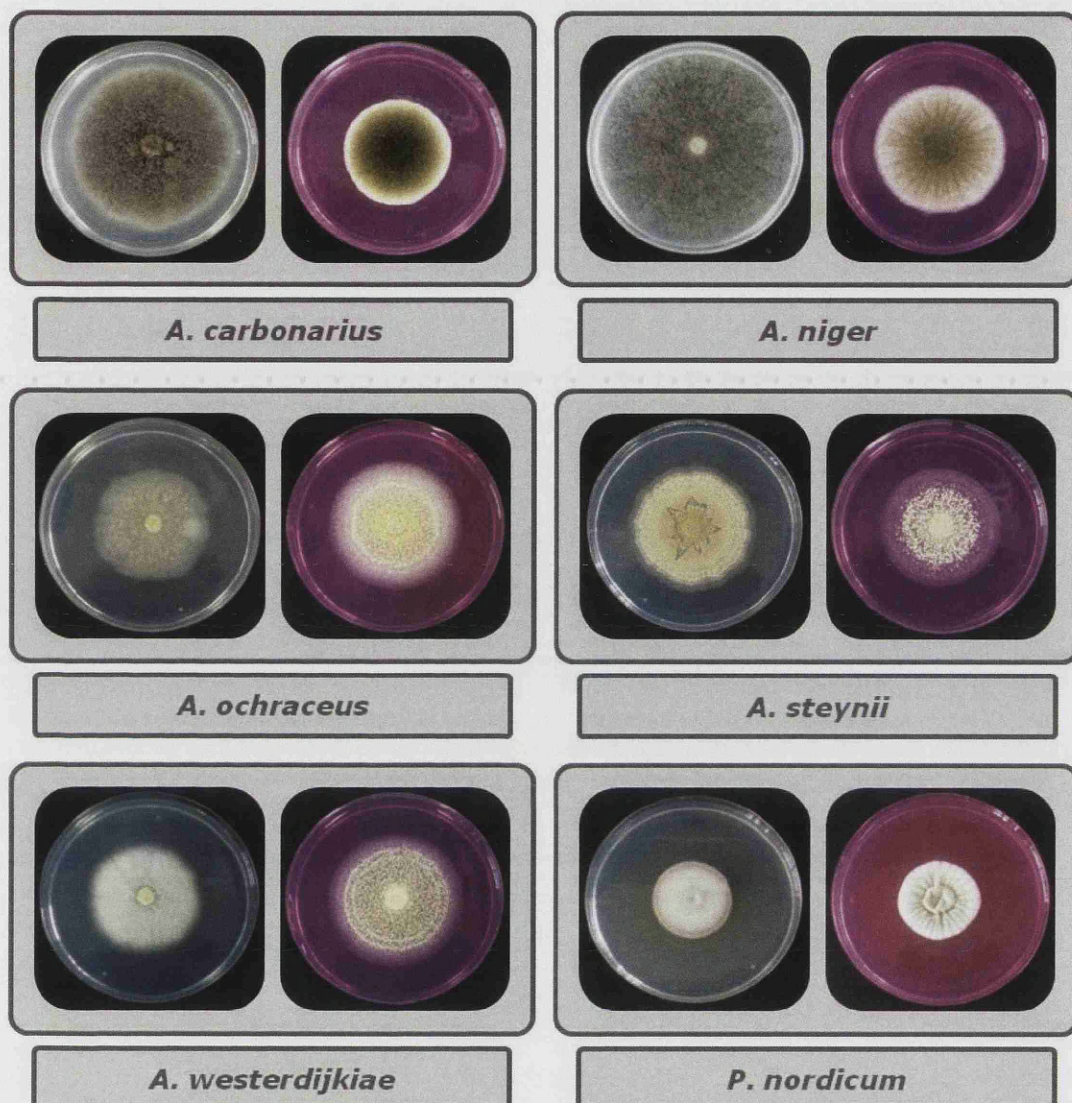
A parte de las especies citadas incluidas en las secciones Circumdati y Nigri, se ha demostrado, en contadas ocasiones, la capacidad de producir OTA por *A. alliaceus* y *A. albertensis* (sección Flavi), *A. wentii* (sección Cremei) y *A. glaucus* (sección Aspergillus) (Chelkowski *et al.*, 1987; Varga *et al.*, 1996; Bayman *et al.*, 2002).

Por otro lado, dentro del género *Penicillium* también se clasifican distintas especies ocratóxigenas (Barlow *et al.*, 2008). La primera vez que se detectó la producción de OTA en este género fue en *P. viridicatum* (Van Walbeek *et al.*, 1969). Sin embargo, los cambios en la taxonomía que se han llevado a cabo en los últimos años, han hecho que las cepas productoras de OTA se engloben únicamente en dos especies, *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Cabañas *et al.*, 2010). La primera se considera una de las principales especies productora de OTA en cereales en zonas con clima frío (Lund & Frisvad, 2003; Elmholt & Rasmussen, 2005) aunque recientemente también se ha descrito la presencia de cepas ocratóxigenas de esta especie en zonas de climas cálidos (Bragulat *et al.*, 2008; Cabañas *et al.*, 2008). *P. nordicum* no se ha detectado hasta el momento en los sustratos típicamente contaminados por *P. verrucosum* y, parece ser que se suele encontrar en la superficie de productos cárnicos como por jamón, salchichas o salami (Battilani *et al.*, 2007; Sonjak *et al.*, 2011).

En la figura 1.3 se muestran, a modo de ejemplo, las imágenes de algunas de las principales especies productoras.

## 2.5.- BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A

La propuesta más aceptada actualmente sobre la ruta biosintética de la OTA es la que publicaron Huff y Hamilton hace más de treinta años (Huff & Hamilton, 1979). Estos autores proponen tres etapas principales en la síntesis de OTA. En la primera de ellas se produce la biosíntesis del anillo isocumarínico a partir de acetato y malonato, posiblemente siguiendo una ruta que implica a una enzima poliquétido sintasa y en la que se forma melleína como producto final. Posteriormente, la melleína es metilada y oxidada, formando ocratoxina β (OT-β) y, finalmente, un



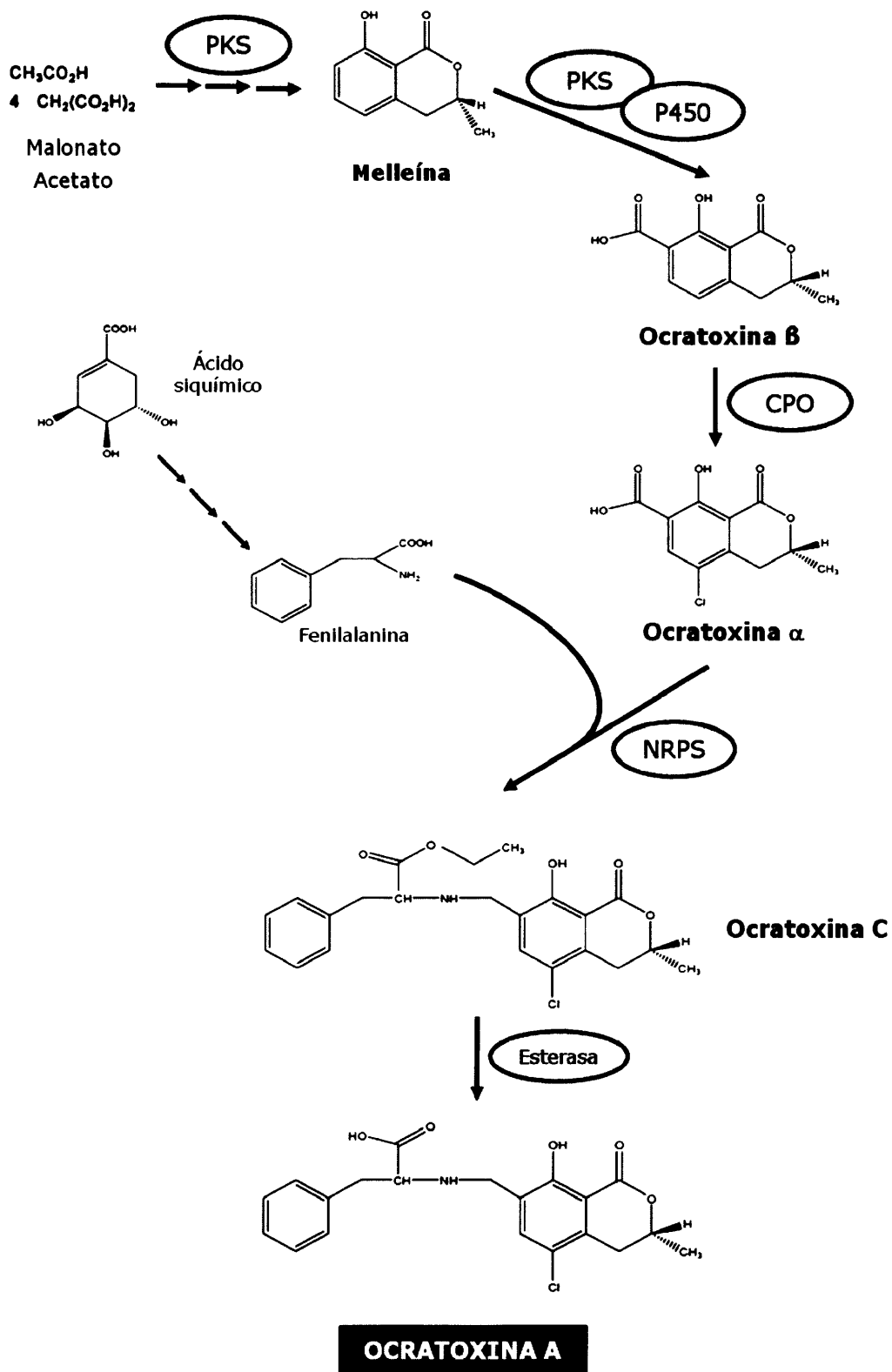
**Figura 1.3.** Principales especies productoras de OTA. Se muestra un ejemplo de las cepas de *A. carbonarius* 325, *A. niger* CECT 2091, *A. ochraceus* CECT 2969, *A. steynii* 3.53, *A. westerdijkiae* CECT 2948 y *P. nordicum* BFE 487, cultivadas en placas de Agar Czapek (izquierda) y Rosa de Bengala con cloranfenicol tras 7 días de incubación.

átomo de cloro es incorporado a la molécula para formar la OT- $\alpha$ . Independientemente, se produce la síntesis de fenilalanina mediante la ruta del ácido siquímico y su activación mediante esterificación. En una última etapa, el aminoácido se une a la molécula de OT- $\alpha$  mediante la enzima OTA sintetasa. Este paso supone la formación de ocratoxina C que finalmente se hidroliza para formar la molécula de OTA (Niessen *et al.*, 2005). La OTB se forma mediante decloración de la OTA (Huffman *et al.*, 2010).

Un esquema de los pasos que ocurren en la síntesis de OTA así como de la localización de los posibles puntos de actuación de las enzimas se muestra en la figura 1.4. Los distintos estudios sobre la ruta de síntesis de OTA indican que la formación del anillo isocumarínico y la metilación de la melleína se deben llevar a cabo por una enzima poliquétido sintasa (PKS) (Geisen & Schmidt-Heydt, 2009). Asimismo, se postula la implicación de una enzima del tipo de las citocromo p450 monooxigenasas (P450) que oxidaría la melleína y de una cloroperoxidasa (CPO) que incorporaría el átomo de cloro a la OT-β (Huffman *et al.*, 2010). La enzima que Huff & Hamilton (1979) denominaron OTA sintetasa y que sería la responsable de unir la OT-α con la fenilalanina debe corresponderse probablemente con una sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) (Geisen & Schmidt-Heydt, 2009).

Los genes que están implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios fúngicos, como las micotoxinas, suelen estar formando agrupaciones o *clusters* (Keller & Hohn, 1997). De esta manera se ha comprobado que los genes asociados con la síntesis de fumonisinas, aflatoxinas y tricotecenos, entre otros, se encuentran agrupados en la misma región del genoma (Yu *et al.*, 2004; Desjardins & Proctor, 2007). En el caso de los genes implicados en la producción de OTA en *P. nordicum*, se ha observado que existen dos agrupaciones génicas diferentes. En un primer momento, se encontró una región de 10 kb donde se encontraban tres genes que codificaban para una enzima PKS, una NRPS y una alcalin serín proteasa; los niveles de expresión de los dos primeros se relacionaban con la síntesis de toxina (Karolewicz & Geisen, 2005). Posteriormente, los mismos autores describieron otra agrupación de 4,3 kb en la que se encontraba un gen que codificaba para una enzima del tipo CPO y otro que codificaba para un transportador que sería el encargado de expulsar la OTA al exterior celular (Geisen *et al.*, 2006). Por otro lado, estos autores han estudiado los genes implicados en la síntesis de OTA en *P. verrucosum*, una especie muy relacionada filogenéticamente con *P. nordicum*, donde no han encontrado la presencia de estas mismas agrupaciones génicas aunque sí han descrito otros genes con similares funciones (Bogs *et al.*, 2006; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008b).

El estudio de los genes implicados en la síntesis de OTA en el género *Aspergillus* está mucho menos avanzado que en *Penicillium*. O'Callaghan *et al.* (2003) publicaron la secuencia completa de un gen que codificaba para una PKS en *A. ochraceus* claramente implicado en la ruta de síntesis de la toxina ya que los mutantes con el gen interrumpido son incapaces de producir OTA.



**Figura 1.4.** Esquema de la ruta de síntesis de OTA propuesta por Huff & Hamilton (1979). Se indican los compuestos que se van obteniendo en cada uno de los pasos así como las posibles enzimas que podrían intervenir. PKS: poliquétido sintasa. P450: citocromo p450 monooxigenasa. CPO: cloroperoxidasa. NRPS: sintetasa de péptidos no ribosomales.

Posteriormente, los mismos autores describieron otro gen, *p450-B03*, que codificaba para una enzima P450 cuyos niveles de expresión se correlacionaban con los niveles de toxina (O'Callaghan *et al.*, 2006). En estudios llevados a cabo en nuestro grupo en colaboración con la Universidad de Cork, se ha visto que los genes *pks* y *p450-B03*, se encuentran en una misma región del genoma separados por otro gen, *nrps*, que codifica para una NRPS (González-Salgado, 2009). Estos datos apoyan la teoría de que en el género *Aspergillus* los genes implicados en la síntesis de OTA también se encuentran agrupados como ocurre en el caso de otras micotoxinas.

Otros estudios que se han llevado a cabo en los últimos años han descrito distintos genes con gran homología con los que codifican para enzimas del tipo PKS y que parecen correlacionarse con la síntesis de OTA en *A. carbonarius* (Gallo *et al.*, 2009) y *A. westerdijkiae* (Bacha *et al.*, 2009).

## 2.6.- LEGISLACIÓN

Actualmente, numerosos países cuentan con una regulación sobre los niveles máximos de micotoxinas en distintos productos alimenticios (Van Egmond *et al.*, 2007). El Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) en su dictamen sobre la OTA aconsejó a la Unión Europea que sería prudente que se redujera todo lo posible la exposición a la misma (SCF, 1998). Siguiendo esta directriz, la Unión Europea dictó la primera regulación sobre el contenido máximo de OTA en alimentos en el año 2002 donde únicamente se mencionaban los niveles máximos permitidos de toxina en cereales y uvas pasas (Comisión Europea, 2002b). Posteriormente, al aparecer nuevas matrices alimentarias susceptibles de estar contaminadas con OTA y debido al aumento de los estudios que establecían los problemas para la salud humana y animal que podía producir la toxina, la Unión Europea aumentó el ámbito de aplicación de la regulación a alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad (Comisión Europea, 2004) así como a café, vino y zumos de uva (Comisión Europea, 2005a). En 2006, se dictó una normativa conjunta donde se reducían los límites máximos de OTA que se podían encontrar en la mayor parte de estos sustratos (Comisión Europea, 2006b) y, recientemente, se ha ampliado la regulación con la incorporación de nuevas matrices como las especias y el regaliz (Comisión Europea, 2010a). En la tabla 1.2 se recogen los productos y los niveles máximos de OTA permitidos que se dictan en los dos últimos reglamentos mencionados.

Además de esta legislación común, algunos países de la Unión Europea regulan los niveles máximos de OTA en otros productos que frecuentemente se consumen

por sus ciudadanos y, en otras regiones se regula la presencia de toxina en los piensos para alimentación animal (Duarte *et al.*, 2010a).

Producto		Máximo OTA (µg/kg)
Cereales	Cereales no elaborados	5
	Productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo a excepción de los productos alimenticios destinados a lactantes y niños	3
	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,5
Café	Café tostado en grano y café tostado molido, con excepción del café soluble	5
	Café soluble (café instantáneo)	10
Uvas y derivados	Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades)	10
	Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15% vol.) y vinos de frutas	2
	Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2
	Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinado al consumo humano directo	2
Especias	<i>Capsicum</i> spp. (frutos de dicho género secos, enteros o pulverizados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón)	30 (desde el 1/7/2010 hasta el 30/6/2012)
	<i>Piper</i> spp. (frutos, incluyendo la pimienta blanca y negra)	
	<i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada)	
	<i>Zingiber officinale</i> (jengibre)	15 (a partir del 1/7/2012)
	<i>Curcuma longa</i> (cúrcuma)	
Regaliz	Mezclas de especias que contengan una o más de las especias antes mencionadas	
	Raíz de regaliz, ingrediente para infusiones	20
Otros	Extracto de regaliz, para uso alimentario, especialmente en bebidas y confitería	80
	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0,5

**Tabla 1.2.** Contenido máximo de OTA en los productos que se recoge actualmente en la legislación marcada por la Unión Europea (Comisión Europea 2006b; Comisión Europea, 2010a).

### **3. *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI**

#### **3.1.- TAXONOMÍA DE LA SECCIÓN CIRCUMDATI**

Raper & Fennel (1965) realizaron una taxonomía muy completa del género *Aspergillus* basada en caracteres morfológicos y culturales de los hongos y fueron los primeros que agruparon las especies similares con pequeños conidios ocre o amarillos en lo que denominaron el grupo de *A. ochraceus*. Sin embargo, no fue hasta 1985 que se empezó a utilizar el término sección Circumdati para denominar a este grupo de hongos (Gams *et al.*, 1985). En un primer momento sólo comprendía nueve especies pero posteriormente se fueron describiendo otras nuevas utilizando métodos tradicionales que también se incluyeron en este grupo (Christensen & Raper, 1978; Tuthill & Christensen, 1986; Zotti & Montemartini-Corte, 2002).

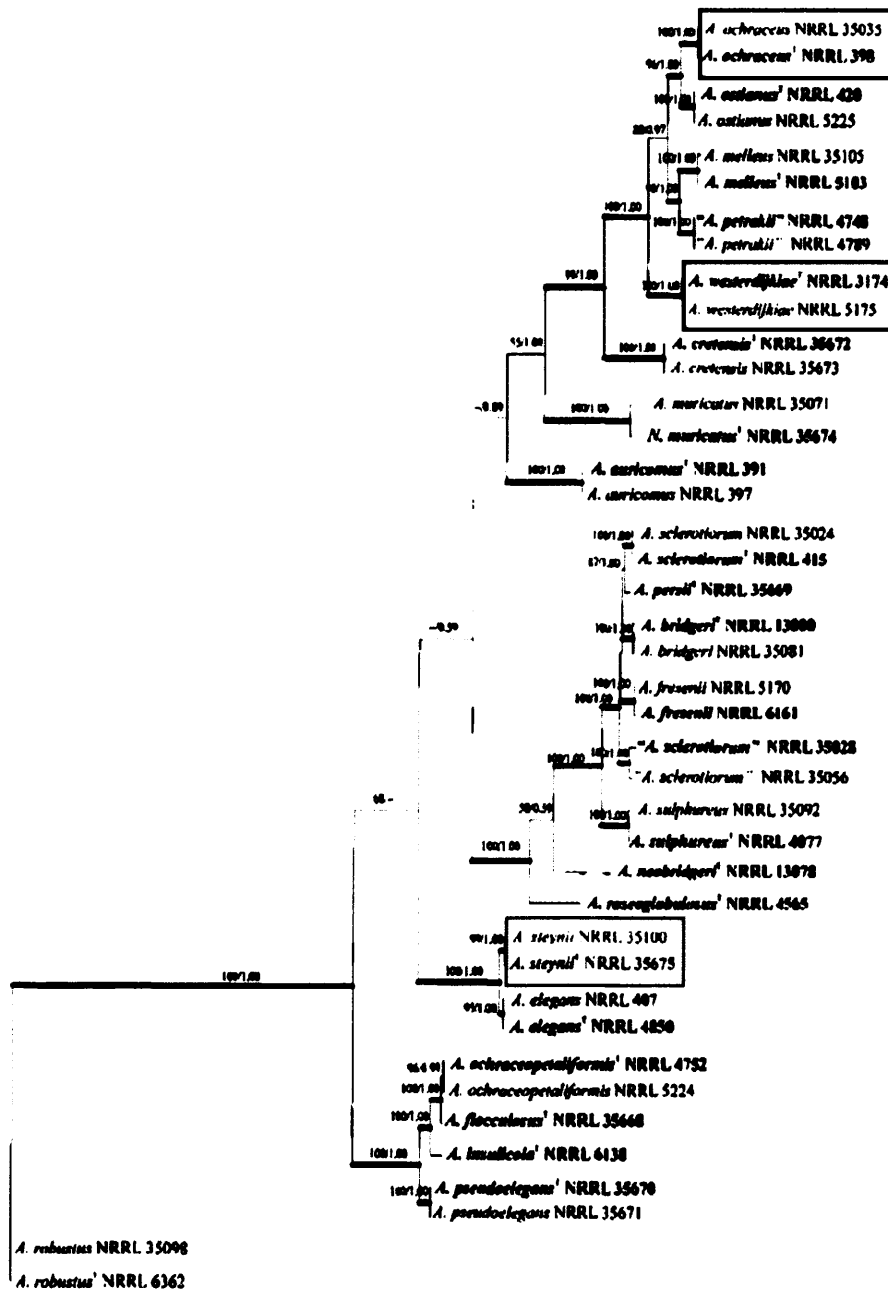
En los últimos años, las técnicas moleculares han ido implantándose entre los taxónomos porque facilitan el estudio de los organismos y permiten conocer la evolución que se ha producido entre ellos, lo que favorece a la aparición de nuevas especies. La mayor revisión de la sección Circumdati que se ha realizado hasta el momento fue la publicada por Frisvad *et al.* (2004). En ella, se realizó un estudio filogenético basado en secuencias del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina de una gran variedad de aislamientos y describieron siete nuevas especies, lo que elevó a 20 el número de especies incluidas en la sección Circumdati.

Recientemente se ha publicado un exhaustivo análisis filogenético de todo el género *Aspergillus* basado en el análisis de secuencias de cuatro secuencias diferentes que se correspondían con la región ITS1-5,8S-ITS2 y con los genes que codifican para la  $\beta$ -tubulina, la calmodulina y la RNA polimerasa II (Peterson, 2008). En la figura 1.5 se muestra el dendrograma obtenido en ese trabajo utilizando distintos aislamientos correspondientes a especies incluidas en la sección Circumdati.

#### **3.2.- PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS POR ESPECIES DE LA SECCIÓN CIRCUMDATI**

La producción de micotoxinas, en especial de OTA, por las especies de esta sección ha sido desde hace tiempo un tema muy controvertido, ya que los autores no se ponen de acuerdo en si las especies son capaces de producir la toxina y cuál es la contribución de cada una de ellas a la contaminación en productos alimentarios (Batista *et al.*, 2003; Samsom *et al.*, 2006; Palumbo *et al.*, 2007). Determinados

autores defienden la teoría de que algunas de las especies de la sección no son capaces de producir OTA ya que las cepas pueden ser formas intermedias entre otras especies conocidas (Frisvad *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2006).



**Figura 1.5.** Árbol Filogenético de la sección Circumdati basado en las secuencias de los genes que codifican para la  $\beta$ -tubulina, calmodulina y RNA polimerasa II y la secuencia de la región ITS1-5,8S-ITS2 (Peterson, 2008). Se destacan las especies que se han estudiado en este trabajo: *A. ochraceus* (verde), *A. westerdijkiae* (rosa) y *A. steynii* (amarillo). *A. robustus* es el aislamiento utilizado como fuera de grupo.



Frisvad *et al.* (2004) señalaron que de las especies incluidas en la sección Circumdati, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* podrían ser las principales productoras de OTA en matrices alimentarias. Sin embargo, hasta esta tesis, la capacidad de producir OTA de cada una de ellas no había sido establecida.

Algunos autores quitan importancia a *A. ochraceus* como productor de OTA, ya que defienden que los aislamientos productores que se habían descrito en trabajos anteriores a 2004, deberían ser re-clasificados al corresponderse con cepas de *A. westerdijkiae* (Samson *et al.*, 2006; Marino *et al.*, 2009).

En numerosos estudios llevados a cabo desde hace tiempo, se ha visto que distintas especies de la sección Circumdati pueden producir otras micotoxinas como ácido penicílico, xantomegninas, vioxantina o viomelleina (Ciegler, 1972; Stack & Mislivec, 1978; Stack *et al.*, 1983; Frisvad *et al.*, 2004). Además, se ha visto que las especies incluidas en esta sección son las únicas, hasta el momento, capaces de formar unos alcaloides denominados circumdatinas (Rabaek & Breinholt, 1999; Rabaek *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 2001; López-Gresa *et al.*, 2005). Dentro de este grupo se encuentra la circumdatina H que es considerada una micotoxina ya que es capaz de afectar a la cadena respiratoria en la mitocondria de mamíferos (López-Gresa *et al.*, 2005).

### 3.3.- PRESENCIA DE ESPECIES DE LA SECCIÓN CIRCUMDATI PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A EN MATRICES ALIMENTARIAS

*A. ochraceus* fue considerado durante mucho tiempo el principal productor de OTA de la sección Circumdati (Pitt, 2000b). La importancia de esta especie radicaba principalmente en su presencia en café donde se consideraba la principal fuente de OTA (Urbano *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003). Además, *A. ochraceus* era una de las principales especies contaminantes en uvas y cereales debido a la gran capacidad de producción de las cepas aisladas de estos sustratos que superaban hasta en diez veces los niveles de toxina producidos por otros aislados del género *Penicillium* o de *Aspergillus* sección Nigri (Czerwieski *et al.*, 2002; Bellí *et al.*, 2004).

Sin embargo, la importancia de *A. ochraceus* disminuyó después de la descripción de *A. westerdijkiae* como una nueva especie (Frisvad *et al.*, 2004). En numerosos trabajos se ha encontrado esta última en distintos sustratos como uvas (Díaz *et al.*, 2009), café (Leong *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2008) o cacao (Copetti *et al.*, 2010) y su presencia ha sido igual o incluso más frecuentemente descrita que

la de *A. ochraceus* (Magnoli *et al.*, 2007a; Riba *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2009; Copetti *et al.*, 2010).

Según Samson *et al.* (2006), la tercera especie productora de OTA más importante en la sección Circumdati es *A. steynii*. Probablemente debido a su reciente descripción, hasta esta tesis la presencia de esta especie se había descrito en muy pocas ocasiones y únicamente en café (Leong *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2008).

### 3.4.- FACTORES QUE DETERMINAN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN LAS PRINCIPALES ESPECIES DE LA SECCIÓN CIRCUMDATI

D'Mello & MacDonald (1997) dividieron los factores que pueden afectar a la producción de micotoxinas en tres grupos: biológicos, químicos y físicos. Los factores biológicos se basan en las interacciones entre el hongo colonizador y el propio sustrato u otros organismos presentes en él. La susceptibilidad del sustrato a ser colonizado y la competencia que se puede establecer con otros microorganismos son determinantes para que los hongos puedan crecer y producir toxinas (Chu & Bhatnagar, 2003). Otro factor biológico muy importante son los insectos ya que pueden contribuir al aumento de micotoxinas en los sustratos tanto actuando como vectores de los hongos como provocando heridas en las plantas que las hacen más accesibles a éstos (Bhatnagar *et al.*, 2004). También se incluyen dentro de este grupo los factores intrínsecos del hongo que hacen que algunas cepas sean capaces de producir toxinas y otras no (Hussein & Brasel, 2001).

Los factores químicos también pueden afectar a la producción de micotoxinas e incluyen, fundamentalmente, la aplicación de fungicidas y otros productos que pueden reducir el crecimiento fúngico (Zain, 2010). El uso y problemas de estos compuestos se tratarán más adelante cuando se expongan los métodos de control de la producción de micotoxinas en los alimentos.

Según D'Mello & MacDonald (1997) los factores que más afectan a la producción de micotoxinas en los productos alimentarios son los físicos, destacando la temperatura y la humedad como los más determinantes.

El efecto de los factores ecofisiológicos sobre *A. ochraceus* ha sido ampliamente estudiado debido a que, como se ha comentado anteriormente, fue la primera especie productora descrita y una de las más importantes durante mucho tiempo. Se ha visto que tanto la temperatura como la actividad de agua ( $a_w$ ) tienen una gran influencia sobre el crecimiento y la producción de OTA del hongo y se han

establecido unos intervalos óptimos entre 25-30 °C y  $a_w$  entre 0,95-0,99 (Ramos *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2006a; Pardo *et al.*, 2006b). Sin embargo, se ha comprobado que la habilidad de *A. ochraceus* para producir OTA varía considerablemente dependiendo del sustrato donde esté creciendo, siendo incluso en alguno de ellos incapaz de producir la toxina. Por ejemplo, Pardo *et al.* (2006b) señalaron que la capacidad productora del hongo era elevada cuando crecía directamente sobre granos de café verde y disminuía cuando el sustrato eran granos de cebada. Además, estos autores comprobaron una reducida producción de toxina en uvas, mientras que Kapetanakou *et al.* (2009) describieron que el hongo es incapaz de sintetizar OTA si el sustrato son uvas pasas.

Actualmente, se dispone de pocos datos con respecto al efecto que pueden tener los factores ecofisiológicos sobre *A. westerdijkiae* y *A. steynii*. Abdel-Hadi & Magan (2009) estudiaron el efecto de la  $a_w$  y la temperatura sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de OTA en estas especies y vieron comportamientos diferentes en cada una de ellas. Las condiciones donde *A. steynii* alcanzaba el crecimiento máximo coincidían con las de máxima producción de OTA (30 °C y  $a_w$  0,99). Sin embargo, en el caso de *A. westerdijkiae* había diferencias en la  $a_w$ , 0,95 como óptimo para producción y 0,99 para crecimiento, aunque en ambos casos la temperatura más adecuada era 25°C.

#### **4. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS OCRATOXÍGENOS**

La distribución de la OTA en los alimentos suele ser muy heterogénea por lo que la detección de la toxina directamente en ellos precisa del desarrollo de protocolos específicos para poder obtener una muestra representativa (Cousin *et al.*, 2005). Debido a esta dificultad, la Unión Europea ha regulado los procedimientos de muestreo y procesamiento de las muestras para el correcto análisis de OTA lo que supone un problema al ser necesario tomar, en algunos casos, hasta 100 muestras (Comisión Europea, 2006b; Comisión Europea, 2010c).

En varios trabajos se ha visto que productos agrícolas muy contaminados con hongos ocratoxígenos se relacionan con concentraciones de OTA que exceden los límites legales (Lund & Frisvad, 2003; Schmidt *et al.*, 2004; Mulè *et al.*, 2006). Por ello, la detección temprana de especies productoras de OTA es un aspecto relevante para evitar que la toxina entre en la cadena alimentaria (Dao *et al.*, 2005).

Los métodos tradicionales para la detección de hongos en matrices alimentarias suponen el aislamiento del hongo en cultivo y su posterior identificación basándose en la apariencia de la colonia en diferentes medios así como en las características de las distintas estructuras fúngicas (conidios, conidióforos, etc.) observadas por microscopía (Hawsksworth *et al.*, 1996; Nicholson & Innes, 2004). Estas técnicas requieren mucho tiempo y un personal experto en taxonomía fúngica (Niessen, 2007; Sartori *et al.*, 2010). Dentro del género *Aspergillus*, la identificación por métodos tradicionales es especialmente difícil al englobar un gran número de especies muy relacionadas (Niessen, 2007).

Por otro lado, las técnicas tradicionales de identificación fúngica son difícilmente aplicables para la cuantificación de los hongos presentes en los alimentos debido a que la homogeneización correcta de las agrupaciones de esporas y del micelio es prácticamente imposible (Pitt, 1984). Además, el medio utilizado puede afectar a la abundancia relativa de las especies, lo que también puede suponer que se asuman conclusiones erróneas (Nicholson & Innes, 2004).

Actualmente, las técnicas moleculares se consideran una buena alternativa a los métodos tradicionales y han sustituido a estos en muchos campos del análisis de alimentos (Feng, 1997; Niessen *et al.*, 2005). Los métodos moleculares basados en DNA son rápidos y permiten la identificación adecuada de las especies fúngicas debido a su alta especificidad (Niessen, 2007; Borman *et al.*, 2008). En los últimos años, se han desarrollado distintos tipos de protocolos moleculares para la detección de hongos toxígenos en alimentos (Cousin *et al.*, 2005; Soriano, 2007; Abdin *et al.*, 2010). A continuación, se explican con detalle las técnicas que más se han utilizado o las que están aportando mejores soluciones a los problemas de la detección de especies fúngicas en matrices alimentarias.

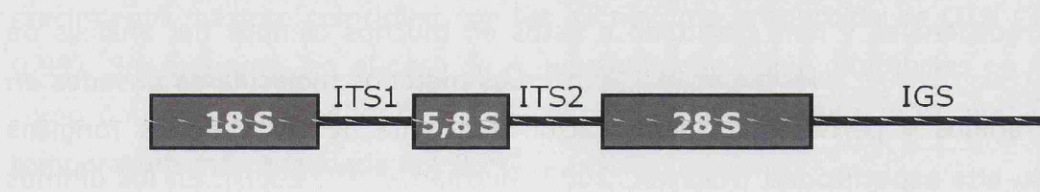
#### 4.1.- PCR CONVENCIONAL

La idea inicial de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis en 1983, pero tal y como la conocemos actualmente con el uso de una DNA polimerasa termoestable no fue publicada hasta 1988 (Saiki *et al.*, 1988). A partir de una única copia de un fragmento de DNA podemos obtener infinidad de ellas de manera que se pueden apreciar en un gel de agarosa.

El diseño de los cebadores es un paso clave para la detección específica de los hongos en las matrices alimentarias. Se han desarrollado distintos protocolos de PCR para detectar distintas especies de *Aspergillus* productoras de OTA usando como secuencia diana genes constitutivos (Perrone *et al.*, 2004; Susca *et al.*, 2007)

o genes de la ruta biosintética de la toxina (Schmidt *et al.*, 2004; Dao *et al.*, 2005; Spadaro *et al.*, 2010).

La secuencia del rDNA también se ha utilizado habitualmente para el diseño de cebadores en hongos y un esquema de la misma se representa en la figura 1.6. Las zonas codificantes de los genes 18S, 5,8S y 28S están altamente conservadas y se han diseñado cebadores universales para hongos basándose en sus secuencias (White *et al.*, 1990). Sin embargo los espaciadores intergénicos ITS1, ITS2 e IGS son regiones hipervariables y en muchas ocasiones nos proporcionan secuencias únicas que varían en cada una de las especies (Zhou *et al.*, 2000; Hinukson *et al.*, 2005). Los polimorfismos en las regiones ITS ocurren generalmente a nivel de especie y son muy útiles para diferenciar distintas especies dentro del género *Aspergillus* aunque estén muy relacionadas filogenéticamente (Edwards *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2006; El Khoury & Atoui, 2010). Además, el grado de especificidad que proporcionan estas regiones nos permite detectar la secuencia deseada en muestras complejas de DNA como ocurre cuando se extrae DNA de muestras naturales (Bridge, 2002).



**Figura 1.6.** Representación esquemática de cada una de las unidades del rDNA que están repetidas en tándem. Se indican tanto los genes que codifican para las subunidades del RNA ribosómico 18S, 5,8S y 28S así como las regiones espaciadoras ITS1, ITS2 e IGS.

Por otro lado, los genes que codifican para el rRNA están repetidos en tándem y pueden alcanzar varios centenares de copias por genoma (White *et al.*, 1990). El diseño de los cebadores en estas regiones multicopia permite, por tanto, un aumento de la sensibilidad de los ensayos si se compara con la amplificación de genes con una única copia (Suarez *et al.*, 2005; González-Salgado *et al.*, 2009). Estas regiones han sido utilizadas con éxito en distintas ocasiones en el diseño de cebadores para la detección de importantes hongos ocratoxígenos como las especies del agregado *A. niger* (González-Salgado *et al.*, 2005) y *A. carbonarius* (Patiño *et al.*, 2005). También hay descrito un método de PCR convencional para la detección de *A. ochraceus* basado en las regiones ITS (Patiño *et al.*, 2005), pero la publicación de este trabajo fue contemporánea a la descripción de *A. westerdijkiae* como una nueva especie por lo que no es capaz de discriminar entre ambas (González-Salgado, 2009).

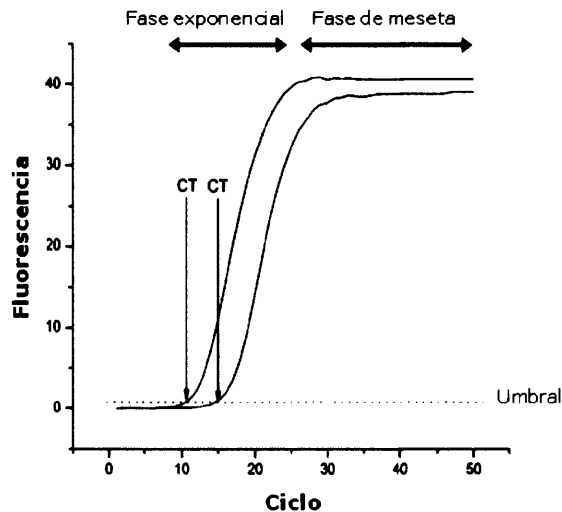
Distintas variaciones de la PCR convencional han sido utilizadas para la identificación de especies ocratoxígenas del género *Aspergillus*. Sartori *et al.* (2006) desarrollaron un protocolo de PCR múltiple con el que se podían detectar *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus* en café en una única reacción de PCR al utilizar cebadores que amplificaban regiones de diferente tamaño en cada una de ellas. Otra de las aproximaciones al diagnóstico de las especies productoras de OTA se ha realizado con lo que se denomina PCR-RFLPs. Esta técnica consiste en digerir con enzimas de restricción fragmentos amplificados por PCR, cuyo resultado es diferente para géneros o especies. Se ha desarrollado con éxito para diferenciar especies de *Aspergillus* sección Nigri (Martínez-Culebras & Ramón, 2007) e incluso para determinar si los aislamientos son capaces de producir OTA o no lo son (Bau *et al.*, 2006; Zanzotto *et al.*, 2006).

#### 4.2.- PCR A TIEMPO REAL

La PCR a tiempo real presenta considerables ventajas con respecto a la PCR convencional que hacen que se aplique cada vez más en la detección de microorganismos contaminantes de alimentos (Fratamico & Bayles, 2005). Esta técnica no sólo proporciona resultados cualitativos (presencia o ausencia de la secuencia diana), sino que también es cuantitativa, permitiendo calcular la cantidad de DNA fúngico de partida y, de esta manera, se puede estimar el nivel de contaminación de una muestra analizada.

En la PCR a tiempo real, el producto es detectado y medido según avanza el proceso por lo que no es necesario que termine la reacción para obtener datos. Además, los resultados pueden ser evaluados sin necesidad de llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa, por lo que se reduce considerablemente el tiempo del ensayo. Otra mejora que aporta esta técnica con respecto a la PCR convencional es que se realiza en un sistema cerrado, reduciéndose así el riesgo de contaminación y la aparición de falsos positivos (Heid *et al.*, 1996).

La cinética de la reacción de PCR a tiempo real se representa en la figura 1.7. Al inicio de la reacción, se produce una fase exponencial en la que el producto aproximadamente se duplica en cada ciclo. Al principio, los niveles de fluorescencia no son detectables; el ciclo en el que se ha acumulado suficiente producto para producir una señal detectable es lo que se denomina ciclo umbral o  $C_T$ , siendo su valor inversamente proporcional a la cantidad de DNA inicial (Mackay *et al.*, 2007).



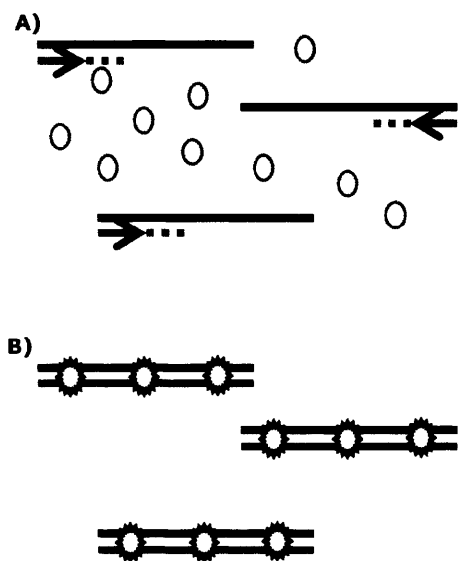
**Figura 1.7.** Cinética de la reacción de PCR a tiempo real. Se representa la señal de fluorescencia frente al número de ciclos de la PCR. Se muestran todas las fases que se suceden durante el proceso así como donde se calculan los valores de  $C_T$ . Modificado de Kubista et al. (2006).

La detección de los productos amplificados es posible debido a la inclusión en la reacción de una molécula fluorescente que informa del aumento de la cantidad de DNA. Los mecanismos más utilizados se basan en sondas de hidrólisis y en agentes intercalantes aunque existe una gran variedad de métodos disponibles como las sondas FRET, *molecular beacons* o cebadores *scorpion*, entre otros (Wilhelm & Pingoud, 2003).

1) Agentes intercalantes. Son fluorocromos que aumentan considerablemente su emisión de fluorescencia cuando se unen al DNA de doble cadena. El más utilizado de todos los disponibles es el SYBR Green I. Este fluoróforo emite muy poca fluorescencia cuando está libre en disolución o unido a DNA de cadena sencilla, pero es capaz de intercalarse en el surco menor de los fragmentos de doble cadena que se forman al avanzar la reacción, lo que produce un incremento sustancial de la señal de fluorescencia emitida por la molécula (Zipper *et al.*, 2004). Un esquema de cómo actúa este agente se muestra en la figura 1.7.

El uso de SYBR Green I ofrece múltiples ventajas ya que es un método simple, bastante sensible y destaca por ser el más económico a la hora de realizar un ensayo de PCR a tiempo real. Sin embargo, se une de manera inespecífica al DNA de doble cadena, por lo que podría dar falsos positivos o una sobreestimación de la diana si se uniera a dímeros de cebadores u otros productos inespecíficos que se pudieran formar (Costa, 2004). Por tanto, es necesario comprobar la especificidad de los productos amplificados en la reacción realizando una curva de disociación, en la que se monitoriza la cinética de disociación de los fragmentos formados aplicando un gradiente creciente de temperatura (Ririe *et al.*, 1997). Los fragmentos

amplificados se disocian al alcanzar su temperatura de fusión ( $T_m$ ), produciéndose una disminución brusca de la señal fluorescente (Wilheim & Pingoud, 2003).

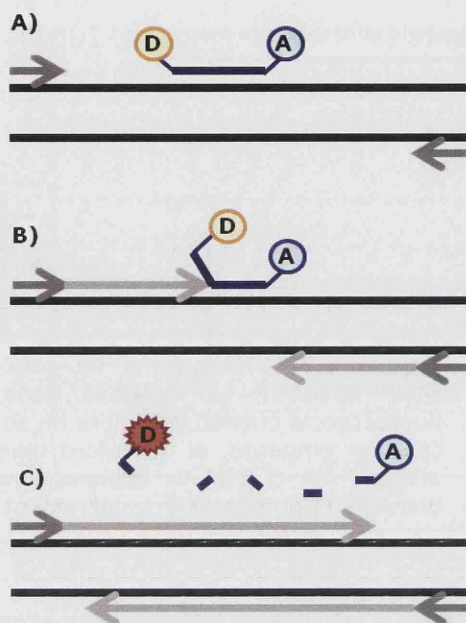


**Figura 1.7.** Mecanismo de acción del SYBR Green I. La molécula tiene baja fluorescencia cuando está libre en solución (A). Sin embargo, el fluoróforo tiene alta afinidad por el DNA de doble cadena y al unirse, su fluorescencia se incrementa (B).

2) Sondas de hidrólisis o sondas TaqMan®. Son oligonucleótidos que se unen específicamente a una región interna del fragmento que se quiere amplificar. Estas sondas están marcadas con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado a determinada longitud de onda y un aceptor en el extremo 3' que la absorbe en esas mismas condiciones. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Durante la amplificación del DNA diana, la polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena e hidroliza el extremo libre 5' de la sonda gracias a su actividad exonucleasa, produciendo la liberación del fluorocromo donador. En ese momento, ambas moléculas están espacialmente alejadas y la fluorescencia emitida es captada por el sistema detector (Mackay *et al.*, 2007). Un esquema de cómo funcionan las sondas de hidrólisis se muestra en la figura 1.8.

Este método de detección tiene la ventaja de su gran especificidad y que permite llevar a cabo reacciones múltiples. Sin embargo, tiene un coste inicial muy alto y el diseño del ensayo puede ser muy complicado (Kubista *et al.*, 2006).





**Figura 1.8.** Mecanismo de acción de las sondas TaqMan®. Cuando el fluoróforo donador se encuentra próximo al aceptor toda la fluorescencia que emite el primero es absorbida por el otro (A). Según avanza la reacción, la polimerasa desplaza la sonda (B) y la hidroliza haciendo que las dos moléculas se separen (C).

\*\*\*\*\*

La PCR a tiempo real se ha utilizado con éxito para la detección de distintas especies de *Aspergillus* productoras de OTA utilizando como diana secuencias de genes de copia única (Geisen *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2004; Mulè *et al.*, 2006; Atoui *et al.*, 2007; Morello *et al.*, 2007; Selma *et al.*, 2008) o múltiple (González-Salgado *et al.*, 2009).

Otra gran ventaja que aporta la PCR a tiempo real es que, además de para la detección específica, puede utilizarse para la estimación de la expresión génica partiendo tanto de RNA como de cDNA (Ginzinger, 2002). Varios protocolos de PCR a tiempo real se han descrito para el estudio de los genes implicados en la síntesis de micotoxinas en distintas especies (Niessen, 2007).

#### 4.3.- Microarrays

Un *microarray* consiste en una serie de oligonucleótidos ordenados sobre un sustrato sólido que se encuentran formando una matriz de secuencias. Los ácidos nucleicos de las muestras que se quieren analizar se marcan, normalmente por métodos fluorescentes, y se incuban sobre el *microarray* en unas condiciones adecuadas, permitiendo la hibridación de estos con las sondas impresas en la superficie (Bowtell & Sambrook, 2003). La mayor ventaja que ofrece esta técnica con respecto a las mencionadas anteriormente es que se pueden analizar

simultáneamente una gran cantidad de secuencias utilizando cantidades muy pequeñas de muestra. Además puede ser fácilmente automatizada disminuyendo la probabilidad de cometer errores (Shaoguang & Dongguang, 2008).

En el estudio de hongos toxígenos, los *microarrays* se han aplicado fundamentalmente para el estudio de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de toxinas (O'Brian *et al.*, 2003; Schmidt-Heydt & Geisen, 2007). En varias ocasiones, este método se ha utilizado con éxito para estudiar de una manera muy rápida la posible inducción o represión de la síntesis de micotoxinas en diferentes condiciones (Schmidt-Heydt *et al.*, 2008a; Schmidt-Heydt *et al.*, 2009; Schmidt-Heydt *et al.*, 2011).

Por otro lado, también existen *microarrays* para la detección e identificación de hongos productores de micotoxinas que utilizan sondas basadas en genes constitutivos de los hongos o de las distintas regiones del DNA ribosómico (Kristensen *et al.*, 2007; Lezar & Barros, 2010).

## **5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA PRESENCIA DE OCRATOXINA A EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS**

Ya se ha comentado anteriormente que la OTA ocurre de manera natural en los alimentos y sus niveles en una gran variedad de productos se encuentran regulados, entre otros, por la Unión Europea (Comisión Europea, 2006b; Comisión Europea, 2010a). Por esto es imprescindible adoptar medidas para evitar que la toxina sea consumida por el ser humano o los animales en los que podría provocar graves problemas para la salud.

Las estrategias para evitar la contaminación por micotoxinas en los alimentos se pueden dividir en dos grupos. Por un lado, la prevención de la producción de las toxinas por parte de los hongos y por otro la destoxificación o eliminación de micotoxinas presentes en los alimentos (Kabak *et al.*, 2006).

### **5.1.- PREVENCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A POR INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO FÚNGICO**

Las estrategias de control de hongos productores de OTA tanto en el campo como durante el periodo de almacenamiento son las estrategias más utilizadas actualmente y las que hasta el momento han dado mejores resultados (Amézqueta *et al.*, 2009; Kabak & Dobson, 2009). Los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos

Control Crítico (APPCC) identifican, evalúan y controlan los peligros importantes para la inocuidad de los alimentos para las personas durante todos los procesos a los que son sometidos hasta que son consumidos. Se basan en el establecimiento de sistemas de gestión de la calidad y engloban las buenas prácticas de fabricación (BPF), buenas prácticas de higiene (BPH), buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de almacenamiento (BPAL). La FAO recomienda la aplicación del sistema APPCC para la prevención y control de micotoxinas en los alimentos y publicó un manual sobre cómo habría que llevarlo a cabo (FAO, 2001).

A continuación se van a explicar las técnicas más utilizadas para el control de hongos en los alimentos, así como las que actualmente se están estudiando y que ofrecen los resultados más prometedores.

#### 5.1.1.- Control de las condiciones de almacenamiento

Los factores físicos y ambientales son los que más afectan al desarrollo fúngico en los alimentos (D'Mello & MacDonald, 1997). Las especies ocratoxígenas suelen estar presentes en la fase de almacenamiento del alimento donde son capaces de proliferar y producir la toxina, principalmente, cuando las condiciones de temperatura y  $a_w$  son adecuadas (Magan *et al.*, 2004). Por ello, el Codex Alimentarius recomienda espacios cerrados con poca humedad y con las menores fluctuaciones de temperatura posibles para el almacenamiento de alimentos susceptibles a la contaminación por OTA (Comisión Codex Alimentarius, 2002).

#### 5.1.2.- Uso de agentes químicos o naturales

Hay una gran cantidad de agentes químicos que se utilizan para inhibir el crecimiento fúngico. Sin embargo, el uso de fungicidas está siendo controlado actualmente debido a que se ha visto que pueden ser perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente (De Costa & Bezerra, 2009). Además, cada vez aparece un mayor número de cepas de hongos resistentes a los tratamientos con fungicidas, principalmente a los denominados de amplio espectro que actúan simultáneamente sobre diferentes dianas en los hongos y que hasta el momento habían sido los más utilizados (McGrath, 2009). Por estas razones, la Unión Europea ha legislado los niveles máximos de residuos de fungicidas que se pueden encontrar en los alimentos (Comisión Europea, 2005b; Comisión Europea, 2008). Además, el uso de fungicidas debe tratarse con mucho cuidado ya que algunos trabajos han demostrado que aunque son capaces de reducir el crecimiento fúngico, en ciertos casos pueden estimular la producción de OTA (Magan, 2006; Medina *et al.*, 2007).

Actualmente, se está estudiando el uso de sustancias naturales como inhibidoras del crecimiento de hongos para su posible uso para el control fúngico porque tienen menor riesgo para el medio ambiente y reducida toxicidad para otros organismos (McGrath, 2009). Distintas sustancias producidas tanto por bacterias, como por hongos y plantas han mostrado efectos similares a los fungicidas (Magan, 2006). Se ha comprobado que muchos de estos compuestos son capaces de reducir tanto el crecimiento como la producción de OTA en distintas especies ocratoxígenas del género *Aspergillus* y destacan los aceites esenciales y los antioxidantes como los principales inhibidores (Soliman & Badeaa, 2002; Palumbo *et al.*, 2007; Aldred *et al.*, 2008; Carmo *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2009; Barberis *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010a).

### 5.1.3.- Control biológico con microorganismos antagónicos

El control biológico utilizando microorganismos antagónicos frente a patógenos de plantas se ha estudiado desde hace mucho tiempo y actualmente se considera una aproximación muy prometedora como alternativa al uso de fungicidas para prevenir la formación de micotoxinas (Wilson & Wisniewski, 1989; Kabak *et al.*, 2006; Pal & Gardener, 2006). Entre las principales ventajas que ofrece el control biológico con microorganismos antagónicos se encuentra la de que es compatible con otros métodos como los agentes químicos (Spadaro & Gullino, 2004). De esta manera, al combinar ambos procedimientos se podría reducir considerablemente el nivel de fungicidas necesario para inhibir el crecimiento del hongo.

Existen varios mecanismos por los cuales los agentes de biocontrol pueden afectar al crecimiento fúngico: producción de sustancias inhibitorias, competencia, parasitismo o inducción de resistencia en el hospedador (Droby *et al.*, 1992; Spadaro & Gullino, 2004).

Actualmente se han propuesto distintos microorganismos que podrían ser aplicados como agentes de biocontrol frente a varias especies de hongos ocratoxígenos. Dentro de los procariotas, destacan las bacterias lácticas como los microorganismos más efectivos al ser capaces de producir varios compuestos que inhiben el crecimiento fúngico (Dalié *et al.*, 2010). Por otro lado, las levaduras son también muy adecuadas para su aplicación como agentes de biocontrol porque presentan características importantes como que son fáciles de producir y aplicar, son seguras para el medio ambiente y la salud humana, su biología se conoce perfectamente y presentan gran especificidad frente a los patógenos de los que son antagonistas (Pimenta *et al.*, 2009). En EEUU existen distintas formulaciones de

productos basados en levaduras como agentes de biocontrol frente a distintas enfermedades causadas por hongos y, a nivel europeo, hay que destacar que existe una patente de la levadura *Candida sake* CPA-1 para el control de enfermedades postcosecha en frutas de pepita ocasionadas por distintos hongos fitopatógenos (Viñas *et al.*, 1998).

Parece ser que el mecanismo más probablemente implicado en el biocontrol de hongos por levaduras es la competencia por los nutrientes (Spadaro & Gullino, 2004; Zhou *et al.*, 2007) aunque en algunos casos se ha visto que pueden parasitar al hongo al producir una matriz extracelular que rodean al micelio impidiendo que pueda captar los nutrientes del medio o incluso degradando la pared celular (Wilson, 1997; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Pimenta *et al.*, 2009). Algunas levaduras son capaces de secretar al medio compuestos denominados toxinas *killer* que se ha visto que pueden inhibir el crecimiento de distintos hongos fitopatógenos (Walker *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2004).

Hasta el momento, se conocen distintas especies de levaduras que son capaces de reducir el crecimiento de hongos ocratoxígenos tanto *in vitro* como sobre sustratos naturales. Algunas especies con las que se ha obtenido buenos resultados son *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum* como agentes biocontrol frente a *A. ochraceus* (Masoud & Kaltoft, 2006) o *Metschnikowia pulcherrima*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Issantchenkia terricola*, *Candida guilliermondii* y *Aureobasidium pullulans* frente a distintas especies de la sección Nigri (Zahavi *et al.*, 2000; Bleve *et al.*, 2006; Dimakopoulou *et al.*, 2008).

Por otro lado, en el caso de algunos hongos toxígenos como *A. flavus*, se ha propuesto la utilización de cepas no productoras de la especie ya que su presencia supone el desplazamiento de las cepas aflatoxígenas reduciendo la concentración de toxina de manera considerable (Abbas *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito este efecto en ninguna especie productora de OTA.

## 5.2.- DESTOXIFICACIÓN DE LA OCRATOXINA A PRESENTE EN LOS ALIMENTOS

Cuando la contaminación de los alimentos no puede ser prevenida, es imprescindible su eliminación de los productos antes de que lleguen al consumidor. Los procesos de destoxificación de OTA suponen tanto su eliminación de los productos contaminados como su inactivación por métodos físicos, químicos o biológicos (Varga & Tóth, 2005; Kabak *et al.*, 2006). La búsqueda de métodos para la descontaminación de alimentos es complicada ya que el tratamiento debe ser fácil

de usar, económico y seguro para la salud del consumidor así como no producir pérdidas nutricionales u organolépticas en el producto (Amézqueta *et al.*, 2009; Kabak & Dobson, 2009).

La legislación europea actual prohíbe la mezcla de productos alimenticios que cumplan los contenidos máximos establecidos con otros que superen estos límites para reducir los niveles de OTA en el producto final (Comisión Europea, 2006b). Asimismo, la Unión Europea impide la destoxificación de los productos destinados al consumo humano con tratamientos químicos como el hidróxido sódico, amonio, bisulfito y formaldehído, entre otros, debido a la producción de compuestos tóxicos y a la reducción del contenido nutricional que supone su uso (Varga & Tóth, 2005; Kabak *et al.*, 2006).

#### 5.2.1.- Métodos físicos

La retirada de los productos colonizados por hongos productores de OTA durante el proceso de fabricación, así como su separación mecánica o el lavado con agua y bicarbonato sódico son buenas estrategias para reducir los niveles de contaminación por la toxina (Varga *et al.*, 2010). Actualmente, se conocen distintos materiales que son capaces de adsorber la OTA como el carbón activado, los aluminosilicatos o la colestiramina (Huwig *et al.*, 2001). Algunos de estos adsorbentes se han aplicado con éxito para la reducción e incluso la eliminación completa de la toxina en bebidas como el vino o la cerveza (Belajová *et al.*, 2007; Var *et al.*, 2008).

Ya se ha comentado que la OTA es una molécula muy estable a altas temperaturas por lo que no es eliminada por los tratamientos térmicos comúnmente utilizados en el procesamiento de alimentos, como la cocción o la pasteurización (Boudra *et al.*, 1995). El café es una de las matrices alimentarias donde más se puede minimizar la contaminación por OTA si se llevan a cabo unas apropiadas técnicas de procesamiento de la materia prima (Bucheli & Taniwaki, 2002). Durante el proceso de tostado que se lleva a cabo en la mayoría de los tipos de café se alcanzan temperaturas de más de 200 °C, lo que produce una reducción considerable de la concentración de OTA (Van der Stegen *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2003; Urbano *et al.*, 2004). Sin embargo, estas temperaturas no pueden ser utilizadas en el tratamiento común de los alimentos, debido a que se produce pérdida tanto de las propiedades organolépticas como nutricionales de los mismos (Kabak *et al.*, 2006).

Otros autores han comprobado que las fermentaciones llevadas a cabo durante el procesado de los vinos o los productos de panadería también reducen en cierta medida la concentración de OTA presente en el producto final aunque, en ningún caso, llegan a eliminar por completo la toxina (Grazioli *et al.*, 2006; Valle-Algarra *et al.*, 2009).

#### 5.2.2.- Métodos biológicos

Estos métodos utilizan microorganismos no patógenos que descomponen, transforman o adsorben la OTA de los alimentos contaminados formando compuestos no tóxicos para el consumidor (Abrunhosa *et al.*, 2010). Muchos expertos piensan que la descontaminación de la OTA por métodos biológicos es la mejor aproximación, ya que supone grandes ventajas con respecto a los otros sistemas al ser muy específica, segura para el medio ambiente y conserva las propiedades nutricionales de los alimentos (Bata & Lásztity, 1999; Abrunhosa *et al.*, 2010).

Existen una gran variedad de enzimas capaces de destoxificar la OTA. La carboxipeptidasa A es producida por distintos microorganismos y degrada la toxina a una molécula menos tóxica, la OT- $\alpha$  (Pitout *et al.*, 1969). En la bibliografía se pueden encontrar varios hongos filamentosos y levaduras capaces de utilizar carboxipeptidasas para destoxificar la OTA destacando los géneros *Rhizopus* y *Trichosporon* así como los *Aspergillus* negros, entre otros (Varga *et al.*, 2000; Molnar *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2005; Abrunhosa *et al.*, 2010).

A parte de la degradación por carboxipeptidasas, Angioni *et al.* (2007) observaron la degradación de OTA por distintos géneros de levaduras utilizando otras rutas pero hasta el momento no se ha dilucidado qué enzimas podrían estar implicadas. Algo similar ocurre con distintas cepas de *A. ochraceus* y *A. wentii* que se han descrito como importantes degradadoras de OTA pero no se conoce cuál es la vía que utilizan (Abrunhosa *et al.*, 2002).

Otro mecanismo eficaz para la descontaminación biológica es la adsorción de la OTA a la superficie de los microorganismos. Tanto las bacterias lácticas como varios géneros de levaduras han sido descritos como adsorbentes de OTA en distintas condiciones (Shetty & Jespersen, 2006; Abrunhosa *et al.*, 2010; Dalié *et al.*, 2010). Este efecto ha sido demostrado en varias ocasiones en *Saccharomyces cerevisiae* tanto en medios sintéticos como en vinos, por lo que se puede deducir que durante la fermentación de los vinos, se debe producir una reducción del contenido en OTA de manera natural debida a la adsorción de la misma por parte de las levaduras

utilizadas en el proceso (Bejaoui *et al.*, 2004; García Moruno *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2006; Cecchini *et al.*, 2006; Nuñez *et al.*, 2008; Bizaj *et al.*, 2009). Otras especies de levaduras de los géneros *Phaffia*, *Candida*, *Kloeckera* o *Rhodotorula* también son capaces de adsorber OTA a su pared (Péteri *et al.*, 2007; Var *et al.*, 2009).

Recientemente, Meca *et al.* (2010) han descrito la absorción de OTA al interior celular como otro mecanismo implicado en la destoxificación por levaduras del género *Saccharomyces* durante la fermentación vínica.

La destoxificación de OTA por distintas cepas no toxígenas de *A. niger* se ha estudiado ampliamente en los últimos años y se ha visto que puede utilizar distintos mecanismos (Abruñosa *et al.*, 2010). Se ha demostrado que esta especie produce enzimas capaces de degradar la toxina como carboxipeptidasas (Varga *et al.*, 2000; Abruñosa *et al.*, 2002), lipasas (Stander *et al.*, 2000) y metaloenzimas (Abruñosa & Venâncio, 2007). Además, Bejaoui *et al.* (2005) vieron que esta especie no sólo es capaz de degradar la toxina, sino que puede reducir la contaminación de OTA mediante su adsorción a la superficie de sus conidios.



## 6. OBJETIVOS

1. Desarrollar protocolos de PCR rápidos y sensibles para la discriminación de las especies productoras de OTA más importantes incluidas en *Aspergillus* sección Circumdati: *A. ochraceus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae*.

2. Aplicar los ensayos específicos diseñados para la detección de estas especies de *Aspergillus* sección Circumdati en dos importantes matrices alimentarias: pimentón y harina de cebada.

3. Desarrollar un ensayo sensible y específico para detectar y cuantificar *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* mediante PCR a tiempo real que permita su aplicación directamente en uvas y café verde.

4. Analizar la capacidad de producción de OTA de cepas de distintos orígenes de *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* y *A. elegans* para determinar la importancia relativa de cada una de ellas.

5. Determinar el efecto de dos factores ecofisiológicos, temperatura y  $a_w$ , sobre el crecimiento y la producción de OTA en *A. steynii* y *A. westerdijkiae* tanto en medio sintético como en medios basados en matrices alimentarias frecuentemente contaminadas por estas especies.

6. Identificar y caracterizar genes implicados en la biosíntesis de OTA en *A. westerdijkiae* y *A. steynii*, desarrollando ensayos de RT-PCR a tiempo real para cuantificar su expresión y comprobar su relación con la síntesis de toxina.

7. Seleccionar un agente de biocontrol capaz de controlar el crecimiento y la producción de OTA en *A. westerdijkiae* y determinar las condiciones óptimas para su actuación.

8. Estudiar los mecanismos implicados en la reducción de la OTA extracelular producida por *A. westerdijkiae* en presencia del agente de biocontrol seleccionado.

# Materiales y Métodos



## **1. MANTENIMIENTO DE CEPAS**

Todas las cepas de hongos filamentosos utilizadas en este trabajo se encuentran recogidas en las tablas 3.1 y 3.6 de la sección Resultados, mientras que las cepas de levaduras se detallan en la tabla 2.4 de la sección Materiales y Métodos. En todos los casos se especifica el origen de la cepa y la especie a la que pertenece. Los hongos filamentosos se sembraron periódicamente en medio agar dextrosa patata (PDA) (Pronadisa, España) y tras incubar durante 4-5 días a 28 °C, se almacenaron a 4 °C. Las levaduras se mantuvieron a 4 °C mediante resiembras periódicas a 27 °C durante 24 horas en medio YMA (*Yeast Morphology Agar*) (Wickerham, 1951). Asimismo, todos los aislamientos fúngicos se almacenaron durante periodos prolongados a -80 °C en glicerol al 15 %.

## **2. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES DE ESPORAS DE HONGOS FILAMENTOSOS Y CELULARES DE LEVADURAS**

Las suspensiones de esporas se prepararon a partir de cultivos esporulados de 7 días en Agar Czapek Dox Modificado (Pronadisa, España) inundados con una solución de suero salino estéril (9 g/l cloruro sódico) con Tween-20 al 0,05%. La suspensión se recogió tras rascar la superficie con una varilla de vidrio y se filtró a través de papel Whatman Nº1. La concentración de las suspensiones se valoró por recuento microscópico utilizando una cámara de Thoma y, cuando fue necesario, se diluyeron hasta las concentraciones adecuadas con suero salino estéril.

Las suspensiones celulares de levaduras se prepararon a partir de un cultivo de 24 h en medio YMB. Las células se concentraron por centrifugación a 13000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en solución salina estéril. Al igual que en el caso anterior la concentración celular fue estimada con un microscopio óptico y una cámara de recuento de Thoma.

### **3. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI**

#### **3.1.- PCR CONVENCIONAL**

##### **3.1.1.- Extracción de DNA fúngico de cultivos puros**

Las distintas cepas de hongos se cultivaron en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de caldo Sabouraud (Pronadisa, España) a 28 °C durante 72 h en un agitador orbital (120 rpm). Posteriormente, los cultivos se filtraron a través de papel Whatman N°1 y los micelios obtenidos se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

El aislamiento de DNA se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos por Querol *et al.* (1992) y Liu *et al.* (2000) partiendo de 100 mg de micelio triturado y homogeneizado con nitrógeno líquido. Ambos protocolos se modificaron añadiendo 50 µl de Zimoliasa 20T (1,5 mg/ml) (ICN Biomedicals, EEUU) y 50 µl de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (2 mg/ml) (Sigma Aldrich, Alemania) al correspondiente tampón de lisis e incubando durante 1 hora a 37 °C. Una vez extraído el DNA genómico se conservó a -20 °C hasta su utilización.

La concentración y pureza del DNA se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU).

##### **3.1.2.- Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR**

Todos los ensayos de PCR convencional se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania). Cada una de las reacciones de PCR contenía 100 ng de DNA molde, 1 µl de cada uno de los cebadores (20 µM), 2,5 µl de tampón 10X (166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,2 µl de mezcla de dNTPs (100mM) (Ecogen, España) y 0,15 µl de Taq polimerasa (5 U/µl) (Biotools, España). El volumen se completó con agua para biología molecular (MO-BIO, EEUU) hasta 25 µl.

##### **3.1.3.- Electroforesis de DNA**

El análisis electroforético de DNA se realizó en geles horizontales de agarosa de alta temperatura de gelificación (Bio-Rad, EEUU) al 2% en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y añadiendo 1 µl de bromuro de etidio (1 µg/ml) por cada 20 ml de tampón. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0,25%) y se aplicaron 20 µl de muestra.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE a voltaje constante y, una vez finalizada, las muestras se visualizaron mediante irradiación con luz UV (Sambrook & Russell, 2001) en un sistema de captación de imágenes E-BOX (Vilber-Lourmat, Alemania). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Lituania) (rango de tamaños entre 100 pb y 3 kb), GeneRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas, Lituania) (25-700 pb) y 2-log DNA ladder (New England Biolabs, Reino Unido) (100 pb-10 kb).

#### 3.1.4.- Secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 y del gen *Btub*

La amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 del DNA ribosómico se llevó a cabo utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* (1990) y el programa de amplificación utilizado por Henry *et al.* (2000). Las secuencias parciales del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina (*Btub*) se obtuvieron para confirmar la identificación de algunas cepas cuando se observaron discrepancias entre lo obtenido con los ensayos de PCR diseñados y la identificación previa de la que se disponía. Se utilizó la pareja de cebadores Bt2a/Bt2b (Glass & Donaldson, 1995) y el siguiente protocolo de amplificación: 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 32 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 68 °C (hibridación) y 1 min a 72 °C (extensión) y una extensión final de 5 min a 72 °C. Las reacciones en ambos casos se realizaron como se describe en el apartado 3.1.2.

Tras la visualización de los productos de PCR en geles de agarosa, se llevó a cabo la purificación de los mismos de la mezcla de reacción con el kit *UltraClean™ PCR Clean Up* (MO-BIO, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la secuenciación de los fragmentos obtenidos se utilizó el equipo ABI PRISM 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA) de la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Todos los productos fueron amplificados en ambas direcciones utilizando la pareja de cebadores ITS1/ITS4 para la región ITS1-5,8S-ITS2 y Bt2a/Bt2b para el gen *Btub*.

Los cromatogramas obtenidos se estudiaron con el programa Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia) y las secuencias fueron analizadas y editadas utilizando el programa EditSeq® del paquete informático DNASTAR 7.1 (Lasergene, EEUU). Además, se comprobó su grado de similitud con otras secuencias depositadas en las bases de datos mediante el paquete de programas BLAST (Altschul *et al.*, 1997) ofrecidos gratuitamente en internet por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Todas las secuencias obtenidas en este trabajo fueron depositadas en la base de datos del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*, <http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

#### 3.1.5.- Análisis filogenético

Con todas las secuencias de los genes que codifican para la  $\beta$ -tubulina y de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 obtenidas de los distintos aislamientos, se llevó a cabo un análisis filogenético. Para la obtención de los árboles se utilizó el programa PAUP 4.0 (Sinauer Associates, EEUU), partiendo de las secuencias depuradas y alineadas con el programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Como elemento fuera de grupo se utilizó el aislamiento de *A. carbonarius* NRRL 4849 cuyas secuencias de ambas regiones (gen *Btub* e ITS1-5,8S-ITS2) fueron obtenidas de las base de datos.

Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando un análisis de parsimonia. Este método se basa en analizar la variación en algunos nucleótidos entre las secuencias, denominados nucleótidos filogenéticamente informativos. Se realizaron 1000 réplicas con búsqueda heurística y adición de secuencias al azar y el algoritmo utilizado fue el TBR (*tree-bisection-reconnection*). Para calcular la precisión de los agrupamientos encontrados se utilizó un análisis de *bootstrap*. Se realizaron 1000 réplicas y se representaron las frecuencias mayores del 50% que apoyan los agrupamientos observados en los nodos de los árboles.

#### 3.1.6.- Diseño de cebadores específicos

Los cebadores específicos para las principales especies de *Aspergillus* productoras de OTA incluidas en la sección Circumdati se diseñaron comparando las secuencias de la región ITS1-5,8S-ITS2 del DNA ribosómico obtenidas como se describió en el apartado 3.1.4, con otras previamente accesibles en las bases de datos tanto de las especies de estudio como de otras especies o géneros de hongos filogenéticamente relacionados o que habitualmente contaminan los mismos productos. Estas secuencias fueron alineadas por el método ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) utilizando el programa MegAlign® incluido en el paquete DNASTAR 7.1 (Lasergene, EEUU). Los cebadores específicos se diseñaron en regiones con mayor variabilidad de secuencia interespecífica pero donde no hubiera variabilidad entre las cepas de la misma especie.

La estructura de las parejas de cebadores diseñadas se analizó con el programa PrimerSelect® del paquete informático DNASTAR 7.1 (Lasergene, EEUU). Se intentó

evitar la formación de bucles en los cebadores así como las hibridaciones inespecíficas entre ambos miembros de la pareja.

En la tabla 2.1 se refleja la secuencia de las parejas de cebadores específicos diseñados para la detección de *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* y *A. steynii*, WESTF/WESTR, OCRAF/OCRAR y STEYF/STEYR, respectivamente, así como su temperatura de fusión y el tamaño del amplicón generado. Además, en la figura 2.1 se muestra la localización de las parejas de cebadores específicos en un ejemplo de alineamiento de secuencias de la región ITS1-5,8S-ITS2 de una cepa de cada una de las principales especies ocratoxígenas del género *Aspergillus*.

Especie	Cebador	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicón	Secuencia
<i>A. steynii</i>	STEYF	76	315 bp	5'-CCACGCGGCCCGCGGGGAG-3'
	STEYR	74		5'-CGGGGGGGACGAGGACCCAAC-3'
<i>A. ochraceus</i>	OCRAF	64	430 bp	5'-CTTTTCTTTTAGGGGGCACAG-3'
	OCRAR	66		5'-CAACCTGGAAAAATAGTTGGTTG-3'
<i>A. westerdijkiae</i>	WESTF	64	430 bp	5'-CTTCCTTAGGGGTGGCACAG-3'
	WESTR	64		5'-CAACCTGATGAAATAGATTGGTTG-3'

**Tabla 2.1.** Secuencia de los cebadores específicos utilizados para la detección de las principales especies productoras de OTA incluidas en la sección Circumdati. T<sub>m</sub>: Temperatura de fusión de los cebadores calculada según el método Marmur (Marmur & Doty, 1962).

### 3.1.7.- Optimización de los ensayos de PCR específicos

Los programas de amplificación utilizados con los cebadores específicos para la detección de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* se detallan en la tabla 2.2.

	WESTF/WESTR			OCRAF/OCRAR		
	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95 °C	5 min	1	95 °C	5 min
Desnaturalización	22	95 °C	30 s	24	95 °C	30 s
Hibridación		63 °C	30 s		62 °C	30 s
Elongación		72 °C	40 s		72 °C	40 s
Elongación final	1	72 °C	5 min	1	72 °C	5 min

**Tabla 2.2.** Protocolos de amplificación utilizados con las parejas de cebadores específicas para la detección de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus*, WESTF/WESTR y OCRAF/OCRAR, respectivamente.





### 3.1.8.- Detección de las principales especies ocratoxígenas de la sección *Circumdati* en matrices alimentarias

Posteriormente, se comprobó la aplicabilidad de los ensayos de PCR diseñados para la detección directa de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* en matrices alimentarias. Se eligieron dos productos que habitualmente se encuentran contaminados con micotoxinas como son el pimentón y las harinas de cebada. En ambos casos, los muestreos se realizaron según dictaba la legislación vigente en la Unión Europea en aquel momento (Comisión Europea, 2006a).

Se analizaron 32 muestras de pimentón (11 de pimentón picante, 17 de pimentón dulce y 4 de pimentón dulce ahumado) facilitadas por empresas distribuidoras en España y que procedían de fábricas envasadoras del producto localizadas en distintos países. Las 30 muestras de harinas de cebada se recogieron en diferentes fábricas españolas productoras de cerveza de Castilla La Mancha (11), Castilla León (8), Andalucía (2), Aragón (7), Comunidad Valenciana (1) y Comunidad de Madrid (1).

Se pesaron 2 gramos de cada una de las muestras y se incubaron durante 1 y 2 días a 28°C en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de caldo Sabouraud con cloranfenicol al 0,5% (Pronadisa, España) en un agitador orbital (120 rpm). Pasado el tiempo de incubación, el contenido del matraz se filtró con una bomba de vacío utilizando papel Whatman Nº1 y el material retenido se conservó a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Para el aislamiento de DNA genómico de las muestras se utilizó el kit comercial *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAgen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 100 mg de muestra homogeneizada con nitrógeno líquido. También se realizó la extracción de DNA de las muestras sin incubar partiendo directamente de 100 mg de producto. Los ensayos de PCR se realizaron como se ha descrito previamente para DNA fúngico puro pero utilizando 200 ng de DNA total en cada reacción. Cada una de las muestras se evaluó por triplicado.

### 3.2.- PCR A TIEMPO REAL

#### 3.2.1.- Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores específicos para la detección de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* mediante PCR a tiempo real se llevó a cabo a partir de alineamientos de la región ITS1-5,8S-ITS2 tal y como se describió previamente en la sección 3.1.6 de Materiales y Métodos.

Los cebadores se diseñaron de manera que el tamaño del amplicón estuviera entre 75 y 200 pb que es lo indicado en ensayos de PCR a tiempo real en microbiología de alimentos (Fairchild *et al.*, 2006). Los cebadores específicos para la detección de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* OCRAQ1 (5'-GCACAGCGCTCGCCG-3') y OCRAQ2 (5'-CTGATTGCGATACAATCG-3') amplifican un fragmento de 76 pb de la región ITS1 de estas especies. La secuencia del cebador OCRAQ1 es complementaria a una zona en la cual se produce una gran deleción en la región ITS1 en las especies de estudio pero no en ninguna de las otras especies filogenéticamente relacionadas, lo que aumenta la especificidad de detección.

Además, se diseñó una pareja de cebadores que amplifica una zona de la región 5,8S del DNA ribosómico. La secuencia de esta región está muy conservada en las distintas especies y géneros de hongos, por lo que se produce amplificación en todos los organismos utilizados en el estudio. Los cebadores 5,8S1 (5'-CGGCATCGATGAAGAACGC-3') y 5,8S2 (5'-CAATGTGCGTTCAAAGACTCG-3') amplifican una región de 86 pb y se utilizaron para demostrar que la reacción de PCR a tiempo real se había llevado a cabo correctamente cuando no había presente DNA de ninguna cepa de *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae*.

### 3.2.2.- Comprobación de la especificidad de los cebadores

La especificidad de los cebadores OCRAQ1/OCRAQ2 e universalidad de 5,8S1/5,8S2 se comprobó por PCR convencional utilizando DNA de todas las cepas que aparecen en la tabla 3.1 de la sección Resultados, siguiendo los protocolos de extracción de DNA, amplificación de DNA genómico y electroforesis de DNA que se describen en el apartado 3.1 de esta sección.

El protocolo de amplificación para ambas parejas constaba de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min y 30 s, 24 ciclos de 30 s a 95 °C (desnaturalización), 20 s a 60 °C (hibridación) y 35 s a 72 °C (elongación) y, finalmente una extensión final de 3 min a 72 °C.

### 3.2.3.- Extracción de DNA genómico para PCR a tiempo real

Para el aislamiento de DNA genómico de cultivos de hongos para su evaluación por PCR a tiempo real se utilizó el *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAgen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar el rendimiento del método de extracción de DNA así como si se obtenía un DNA puro y libre de inhibidores de la reacción de PCR a tiempo real, se evaluaron cinco extracciones independientes de tres cepas de hongos: *A. ochraceus* CECT 2093 y *A. westerdijkiae* CECT 2948 y ALF.

Posteriormente, los DNAs se usaron como molde en las reacciones de PCR a tiempo real con los cebadores específicos OCRAQ1/OCRAQ2 que se llevaron a cabo como se describe más adelante. Previamente al aislamiento de DNA, todas las cepas se cultivaron y procesaron según se describe en el apartado 3.1.1 de esta sección.

Para la validación del ensayo de PCR a tiempo real diseñado también se realizó la extracción de DNA de matrices donde habitualmente se detectan estos hongos tanto naturales como contaminadas artificialmente. El protocolo se utilizó sin variaciones para la extracción de DNA genómico de granos de café verde pero en el caso del aislamiento de DNA de uvas tuvo que ser modificado debido a la compleja composición de la matriz. Por todo esto, se añadió polivinilpirrolidona (PVP para biología molecular, 360 kDa, Sigma-Aldrich, España) al 0,33% en la solución AP2 del kit utilizada en la fase de precipitación, para eliminar los compuestos fenólicos presentes (Malvick & Grunden, 2005).

En todos los casos se partió de 100 mg de material pulverizado con nitrógeno líquido con ayuda de un mortero de cerámica. La concentración y pureza del DNA se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU).

#### 3.2.4- Ensayos de PCR a tiempo real

Los ensayos de PCR a tiempo real se realizaron en un termociclador ABI PRISM 7900IT (Applied Biosystems, España) en la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Las reacciones se prepararon con la mezcla maestra SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, España) que contiene no sólo el fluoróforo SYBR Green I, sino también un tampón adecuado, dNTPs y una DNA polimerasa termoestable en las concentraciones apropiadas.

La composición de la mezcla de reacción en un volumen final de 25 µl fue: 12,5 µl de SYBR® Green PCR Master Mix, 1,2 µl de cada uno de los cebadores (5 µM), 5 µl de DNA molde y 5,1 µl de agua para biología molecular (MO-BIO, EEUU). El protocolo de amplificación utilizado fue el programa estándar del aparato: un ciclo inicial de 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en microplacas de 96 pocillos (MicroAmp® 96-well plates, Applied Biosystems, España).

### 3.2.5.- Optimización del ensayo de PCR a tiempo real

En primer lugar se construyó una curva estándar para determinar la eficacia de la reacción con los cebadores específicos OCRAQ1/OCRAQ2. Para ello se utilizaron diluciones decimales de DNA de la cepa CECT 2093 de *A. ochraceus* desde 50 a  $5 \times 10^{-3}$  ng/μl. Los valores de  $C_T$  se representaron frente al logaritmo de la concentración de DNA inicial de cada dilución y se calculó la eficacia de la reacción en porcentaje (%E) a partir de la pendiente de la recta generada siguiendo las siguientes ecuaciones (Kubista *et al.*, 2006):

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

$$\%E = (E - 1) \times 100$$

Como ya se ha comentado, el fluoróforo SYBR Green I es capaz de unirse a cualquier DNA de doble cadena, por lo que es necesario comprobar la especificidad de los fragmentos amplificados mediante el análisis de la curva de disociación. Se realizó al terminar el programa de PCR a tiempo real y el protocolo fue el siguiente: 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y después una rampa de 20 min en la que la temperatura aumentaba entre 60 y 95 °C. La aparición de un único pico en la derivada negativa de la curva de disociación es un indicador de la amplificación de un solo fragmento en la reacción (Viljoen *et al.*, 2005).

### 3.2.6.- Comprobación de la especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo para la detección de *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* y la no inhibición de la reacción por DNA de otros hongos fue también estudiada en ensayos de PCR a tiempo real usando DNA genómico de especies que habitualmente contaminan las mismas matrices alimentarias. Se realizaron dos grupos de muestras que se evaluaron por separado y que contenían DNA de *A. westerdijkiae* CECT 2948 o *A. ochraceus* CECT 2093 y *A. flavus* M12hip10, *A. tubingensis* Bo75, *A. carbonarius* 242, *Penicillium corylophilum* CECT 2270 y *Fusarium thapsinum* F4094 en distintas concentraciones. La composición así como la proporción de los DNAs utilizados en cada una de las muestras se detallan en las tablas 3.3 y 3.4 de la sección Resultados.

Los valores de  $C_T$  obtenidos se interpolaron en la curva estándar para comprobar si el método podía utilizarse para realizar una aproximación cuantitativa de la contaminación por *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae*.

Además, las mismas mezclas se evaluaron con los cebadores 5,8S1 y 5,8S2 para comprobar la presencia de DNA amplificable en las mezclas de las otras especies distintas a las de estudio.

### 3.2.7.- Estudio de la inhibición del ensayo por la presencia de DNA del hospedador

Con las cinco extracciones independientes de DNA realizadas a partir de cultivos puros de dos cepas de *A. westerdijkiae* (CECT 2948 y ALF) y una de *A. ochraceus* (CECT 2093), se evaluó la inhibición de la reacción por la presencia del DNA del hospedador. Se utilizaron dos productos agrícolas que habitualmente están contaminados por estas especies como son el café verde y las uvas. Para este estudio se utilizaron granos de café verde (*Coffea arabica* L.) de origen Brasil y uvas blancas (*Vitis vinifera* L.) de la variedad Vinalopó (Alicante, España).

Se estudiaron los resultados del ensayo de PCR a tiempo real diseñado con la pareja OCRAQ1/OCRAQ2 de las extracciones antes citadas, en tres situaciones diferentes: DNA del hongo diluido 1:1 en tampón de elución (TE), mezcla 1:1 del DNA del hongo con DNA de uvas no contaminadas (5 ng/μl) y mezcla 1:1 del DNA del hongo con DNA de granos de café verde no contaminados (5 ng/μl).

Los valores de  $C_T$  obtenidos en las tres situaciones diferentes se compararon utilizando el software estadístico SPSS 14.0 (IBM-SPSS, EEUU) aplicando el correspondiente test T-student para muestras relacionadas. El nivel de significación se estableció como  $p \leq 0,05$ .

### 3.2.8.- Detección de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* en muestras artificialmente contaminadas

Las uvas y los granos de café verde que se utilizaron en el ensayo se descontaminaron superficialmente mediante inmersión en etanol absoluto durante 5 minutos seguida de un aclarado en agua destilada estéril. Se dejaron secar al aire y, posteriormente, 2 g de estos productos se contaminaron con 1 ml de suspensiones de esporas del hongo preparadas según el apartado 2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron tres concentraciones de esporas:  $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$  esporas/ml y tres cepas diferentes, *A. westerdijkiae* CECT 2948 y ALF y *A. ochraceus* CECT 2093.

Las muestras inoculadas se incubaron a 28 °C durante 8, 16 y 24 horas antes de la extracción de DNA genómico como se describe en el apartado 3.2.3. También se analizaron muestras inoculadas sin incubar y como control negativo se utilizaron matrices a las que se incorporó 1 ml de suero salino y que se incubaron siguiendo el mismo procedimiento.

## **4. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI**

### **4.1.- CONDICIONES DE CULTIVO**

Para estudiar la capacidad de producir OTA en algunas de las especies incluidas en la sección Circumdati, se analizaron 9 aislamientos de *A. ochraceus*, 10 de *A. steynii*, 18 de *A. westerdijkiae* y 6 de *A. elegans*. Los nombres de las cepas así como su origen se encuentran detallados en la tabla 3.6 de la sección resultados.

El medio elegido para llevar a cabo el ensayo fue CYA, compuesto por Agar Czapek Dox (45,4 g/l) y extracto de levadura (5 g/l), al ser uno de los más comúnmente utilizados para inducir la producción de OTA en estas especies. Una gota de 1,5 µl de una suspensión  $10^7$  esporas/ml de cada uno de los hongos se depositó en el centro de la placa y se incubaron durante 7 días a 28 °C. Cada cepa se analizó en dos placas independientes.

### **4.2.- EXTRACCIÓN DE OCRATOXINA A**

La extracción de OTA del medio se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Bragulat *et al.* (2001). Se extrajeron tres discos de agar del extremo, medio y centro de la zona de crecimiento del hongo utilizando sacabocados de 5 mm de diámetro. Los discos se introdujeron en tubos eppendorf de 2 ml y se añadió 1 ml de metanol para cromatografía preparativa (Merck, España). Los tubos se agitaron con vortex y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente repitiendo la homogeneización cada 15 minutos. Tras ello, se filtraron a través de filtros de jeringa MINISART de 45 µm de poro (Sartorius, España) y los extractos se guardaron a -20 °C hasta el momento del análisis.

### **4.3.- CUANTIFICACIÓN DE OCRATOXINA A**

La concentración de OTA en los extractos se midió por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) siguiendo el método definido por la Organización Internacional para la Estandarización que se refleja en la norma ISO 15141-1 (ISO, 1996a; ISO, 1996b). Se utilizó una columna de fase reversa Tracer Extrasil ODS2 de octadecilsilano (C-18, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm) (Teknokroma, España) a 45 °C en un sistema Perkin Elmer Series 200 acoplado a un detector de fluorescencia (Perkin Elmer, EEUU) con una longitud de onda de excitación y emisión de 330 y 470 nm, respectivamente. La fase móvil contenía fosfato monopotásico 4 mM pH 2,5 y

metanol (33:67) y la tasa de flujo fue de 1 ml/min. La OTA fue eluida y cuantificada comparando con una recta de calibración generada con diluciones de estándares de OTA (OEKANAL®, Sigma-Aldrich, Alemania).

El límite de detección del método fue de 0,1 µg/L de extracto inyectado en el aparato, lo que se traduce en que la menor cantidad de OTA que se podía detectar a partir de extracciones de placas de medio sólido era de  $5 \times 10^4$  µg/g de agar.

## **5. EFECTO DE FACTORES ECOFISIOLÓGICOS EN EL CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y LA ESPORULACIÓN EN *A. westerdijkiae* Y *A. steynii***

### **5.1.- CONDICIONES DE CULTIVO**

Para estudiar el efecto de la temperatura y la  $a_w$ , los hongos se inocularon en medio CYA como se describe más adelante. Además, se estudió el efecto de estos dos factores ecofisiológicos en medios basados en matrices alimentarias como son pimentón dulce (*Capsicum annuum*, España), café verde (*Coffea arabica*, Brasil), uva blanca (*Vitis vinifera*, variedad Vinalopó, España), anís (*Pimpinella anisum*, España), cebada (*Hordeum vulgare*, España) y maíz (*Zea mays*, España). Se prepararon extractos de cada matriz al 6% hirviendo 60 g de cada producto, previamente molidos, durante 30 min en 1 l de agua destilada. Las infusiones se filtraron a través de varias capas de gasa de algodón y se volvieron a enrasar hasta 1 l. Los extractos se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

El medio de cultivo se preparó diluyendo a la mitad el extracto de las matrices y añadiendo 20 g/l de agar bacteriológico (Pronadisa, España). La  $a_w$  se modificó con glicerol, un soluto no iónico (Dallyn & Fox, 1980) hasta obtener niveles de 0,928, 0,964, 0,995. Las condiciones logradas en este último caso son las que se utilizaron como control.

Se seleccionaron dos cepas de *A. westerdijkiae*, CECT 2948 y 3.58, y dos de *A. steynii*, 3.53 y Aso2, para llevar a cabo estos ensayos. Se prepararon suspensiones de esporas de cada una de las cepas con una concentración de  $10^7$  esporas/ml según se describe en el Apartado 2 de esta sección y se sembraron 2 µl de cada una de ellas en el centro de las placas. Para comprobar el posible efecto de la temperatura se hicieron tres grupos que se incubaron a 20, 24 y 28 °C. Cada cepa se sembró en dos placas independientes para cada una de las condiciones de temperatura y  $a_w$ .



## 5.2.- MEDIDA DEL CRECIMIENTO FÚNGICO Y PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A

El crecimiento de los hongos se valoró después de 10 días de incubación midiendo dos diámetros perpendiculares y haciendo la media de los mismos hasta que la colonia alcanzó el borde de la placa.

La concentración de OTA en el medio de cultivo se valoró después de 10 días de incubación siguiendo los pasos descritos en los apartados 4.2 y 4.3 de la sección Materiales y Métodos.

## 5.3.- VALORACIÓN DE LA ESPORULACIÓN

El efecto de la temperatura y la  $a_w$  sobre la esporulación fúngica se valoró en los medios basados en matrices alimentarias. Tras 10 días de incubación, se extrajeron 3 discos de agar adyacentes a los utilizados para la medida de la concentración de OTA con un sacabocados de 5 mm de diámetro. Los discos se introdujeron en un tubo Eppendorf de 2 ml y se añadió 1 ml de suero salino estéril con Tween-20 al 0,05%. Las esporas se separaron mecánicamente del agar mediante agitación con vortex y la concentración de esporas en el extracto se valoró por microscopía usando una cámara de recuento de Thoma.

El estudio de la esporulación solo se realizó en las condiciones con una  $a_w$  de 0,964 y 0,995 debido a que en la  $a_w$  más baja de las evaluadas no había micelio suficiente para la extracción de tres discos de agar aparte de los utilizados para la evaluación de la producción de OTA.

## 5.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se usó el programa SAS<sup>®</sup> 9.1 (SAS Institute Inc., EEUU). Las variables estudiadas no seguían una distribución normal, por lo que se aplicaron métodos no paramétricos para su estudio. En el caso de la comparación entre especies, entre cepas de una misma especie y en otros casos donde únicamente había dos niveles, se utilizó el test de suma de rangos de Wilcoxon, mientras que el resto de variables se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. Cuando, en este caso, se encontraron diferencias estadísticamente significativas se utilizó un test no paramétrico de comparaciones múltiples. En todos los casos se estableció el nivel de significación en  $p \leq 0,05$ .

Al aplicar test no paramétricos no se pudo realizar el estudio de la interacción entre variables.

## **6. ESTUDIO DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. westerdijkiae* y *A. steynii***

### **6.1.- ENSAYOS DE PCR CONVENCIONAL PARA EL ESTUDIO DE LOS GENES *pks* Y *p450-B03***

Se realizaron ensayos de PCR convencional con cebadores específicos para los genes *pks* (O'Callaghan *et al.*, 2003) y *p450-B03* (O'Callaghan *et al.*, 2006) para determinar si el aislamiento utilizado por los autores en la descripción de estos genes debería ser re-clasificado. En el caso de la amplificación del gen *pks* se utilizará la pareja de cebadores PKS4-KOF/PKS4-FOR diseñados por O'Callaghan *et al.* (2003) y el siguiente protocolo de amplificación: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 62 °C y 2 min y 30 s a 72 °C, y, como elongación final, 7 min a 72 °C. Los cebadores OCRAp450-1F (5'-GCTTAATACGGTGGTCTACGAG-3') y OCRAp450-2R (5'-CTAAGGCACGTACCAAGTATGG-3') fueron diseñados a partir de la secuencia completa del gen *p450-B03* obtenida por Gonzalez-Salgado (2009). El programa utilizado comprendía una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C seguida de 40 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 52 °C (hibridación) y 2 min a 72 °C (extensión). El programa finalizaba con una extensión de 10 min a 72 °C.

Se evaluó DNA genómico de todas las cepas de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* que se detallan en la tabla 3.6 de la sección Resultados. Los aislamientos de DNA, las reacciones de PCR así como la visualización de los resultados se llevaron a cabo como se describe en los apartados 3.1.1, 3.1.2 y 3.1.3 de la sección Materiales y Métodos.

### **6.2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *pks*, *p450-B03*, *aoks1* Y *nrps* EN *A. westerdijkiae***

#### **6.2.1.- Material biológico utilizado y condiciones de cultivo**

Se eligieron dos cepas ocratoxígenas de *A. westerdijkiae*, CECT 2948 y 3.58, para el análisis de la expresión de los genes descritos como implicados en la ruta de síntesis de OTA. Los ensayos se realizaron en medio CYA, ya que es comúnmente utilizado para estudiar la producción de los aislamientos, y en la superficie de las placas se colocó un celofán estéril (P400, Cannings Ltd, Reino Unido) para facilitar la retirada del micelio. Se sembraron 2 µl de suspensión de esporas ( $10^7$  esporas/ml) en el centro de las placas y se incubaron entre 3 y 8 días antes de la extracción de

RNA. Además se analizó de igual manera la expresión de estos genes en una cepa no productora de OTA, 3.38, en medio CYA.

#### 6.2.2.- Extracción de RNA

Para el aislamiento de RNA total de cultivos fúngicos se empleó el *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAgen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 100 mg de micelio homogeneizado y pulverizado con nitrógeno líquido en un mortero de cerámica. Para eliminar las posibles trazas de DNA que pudieran quedar en el proceso de purificación, se llevaron a cabo dos tratamientos con DNasa I con el kit *RNase-Free DNase Set* (QIAgen, España) durante 20 minutos cada uno.

La concentración y pureza del RNA se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU).

#### 6.2.3.- Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se normalizó partiendo en todas las muestras de 1 µg de RNA total purificado. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en un volumen de 20 µl y la mezcla estaba compuesta por 4 µl de tampón 5X, 2 µl de DTT 100 mM, 2 µl de dNTPs 10 mM, 3 µl de hexámeros al azar 200 µg/ml (Promega Biotech, España), 1 µl de transcriptasa inversa 50 U/µl (Roche, Alemania) y agua libre de RNasa hasta completar el volumen de la reacción. El protocolo de retrotranscripción se llevó a cabo en un Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania) y el programa constaba de dos pasos, uno inicial de 10 min a 30 °C (hibridación) y posteriormente 45 min a 42 °C que es la temperatura óptima de acción de la enzima.

Para descartar la contaminación con DNA y comprobar la integridad del cDNA, se amplificó el gen de la calmodulina mediante PCR convencional utilizando la pareja CALMF (5'-GGCCAGATCACCAAG-3') y CALMR (5'-TCACGGATCATCTCATCGAC-3') (González-Salgado, 2009). Estos cebadores amplifican una región del gen de la calmodulina de algunas especies del género *Aspergillus* y contiene en su interior un intrón. Por ello en el caso de usar como molde DNA genómico se obtiene una banda de 370 pb mientras que en el cDNA es de 300 pb. Estas bandas son fácilmente distinguibles en un gel de agarosa.

Las mezclas de la reacción de PCR se llevaron a cabo como se describe en el apartado 3.1.2 de esta sección con la diferencia de que únicamente se utilizaron 0,6 µl de cDNA y el volumen final de 25 µl se completó con agua para biología molecular. El programa de amplificación constaba de una desnaturalización inicial a

95 °C durante 4 min y 30 s, seguida de 29 ciclos con 30 s a 95°C (desnaturalización), 30 s a 56 °C (hibridación) y 40 s de extensión a 72 °C. Finalmente se realizaba un paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2% según se describe en el apartado 3.1.3 de Materiales y Métodos.

#### 6.2.4.- Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

Para cuantificar la expresión de los genes que previamente se habían descrito como implicados en la síntesis de OTA en *A. westerdijkiae* se utilizó la técnica de PCR a tiempo real. Los cebadores para la amplificación de los genes implicados en la síntesis de OTA se diseñaron en base a la secuencia obtenida de las bases de datos con el número de acceso que se proporciona en los trabajos donde se describen dichos genes. Para el diseño de los cebadores que amplificaban el gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina (*btub*) (gen constitutivo) se utilizaron alineamientos de las secuencias obtenidas con la pareja Bt2a/Bt2b según lo descrito en el apartado 3.1.4 de la sección Materiales y Métodos. Las secuencias de todos los cebadores utilizados se muestran en la tabla 2.3.

Los ensayos de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en las mismas condiciones que se describen en el apartado 3.1.4 pero en este caso se modificó la composición de la mezcla de reacción para ajustarla a un volumen de 20  $\mu$ l. Cada pocillo de la placa contenía 10  $\mu$ l de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, España), 2,6  $\mu$ l de agua para biología molecular, 1,2  $\mu$ l de cada cebador de la pareja a una concentración 5  $\mu$ M y 5  $\mu$ l de una dilución 1:3 del cDNA preparado como se describe en el apartado anterior.

Gen Amplificado	Cebador	Secuencia	Referencias
$\beta$ -tubulina ( <i>btub</i> )	BTUBOCRAF BTUBOCRAR	5'-CTTCCGGTGGCAAGTATGTTC-3' 5'-CATGGTACCGGGCTCAAGAT-3'	-
Poliquétido sintasa ( <i>pks</i> )	PKSOCRAF PKSOCRAR	5'-CCCAGCGATAACGCACTGA-3' 5'-ATGGCGGTGCGGAGAGT-3'	O'Callaghan <i>et al.</i> , 2003
Citocromo p450 monooxigenasa ( <i>p450-B03</i> )	OCRAp450F p450OCRAR	5'-TTTGGCATTGCGGAACTTTAC-3' 5'-CATGTCAAACGTGCGGAAGA-3'	O'Callaghan <i>et al.</i> , 2006
Sintasa de péptidos no ribosomales ( <i>nrps</i> )	NRPSq-F NRPSq-F	5'-GGGAAATGTCAGATAAACGTGT-3' 5'-CGCGCCGACTGGAACCAAT-3'	González-Salgado, 2009
Poliquétido sintasa ( <i>aoks1</i> )	Qpks2WESTF Qpks2WESTR	5'-CCAATCTGGGAGATTTGGCATG-3' 5'-CACGCCTCGCGACTTCCTC-3'	Bacha <i>et al.</i> , 2009

**Tabla 2.3.** Parejas de cebadores utilizadas para el estudio de la expresión de genes implicados en la síntesis de OTA en *A. westerdijkiae*. En la tabla se reflejan los nombres y secuencia de los mismos así como la referencia del trabajo donde se describió por primera vez la secuencia completa de los genes.

El análisis de la expresión de los genes se realizó utilizando el método de cuantificación relativa o  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito por Livak & Schmittgen (2001) utilizando como normalizador la expresión del gen constitutivo *Btub*. Para todas las parejas de cebadores se construyó una curva estándar (Apartado 3.2.5 de Materiales y Métodos) para calcular la eficacia de la reacción ya que este método no se puede aplicar si la diferencia entre la eficacia del gen constitutivo y el estudiado es de más de un 10% (Schmittgen & Livak, 2008).

#### 6.2.5.- Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas en la expresión de los genes, se realizó la comparación de cada una de las cepas productoras con el correspondiente control de no producción utilizando el programa SPSS 14.0 (IBM-SPSS, EEUU). Debido a que los datos no cumplían los criterios de normalidad y/o igualdad de varianzas, se aplicó el test estadístico conocido como U de Mann-Whitney con el que se valoraron las diferencias entre la expresión de los genes en cada cepa productora y la no productora. En todos los casos se estableció un nivel de significación  $p \leq 0,05$ .

### 6.3.- CARACTERIZACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RUTA DE SÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. steynii*

#### 6.3.1.- Obtención de la secuencia completa de un gen que codifica para una citocromo p450 monooxigenasa implicada en la síntesis de ocratoxina A

##### 6.3.1.1.- CLONACIÓN DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

Mediante la técnica de PCR convencional con la pareja de cebadores OCRAp450F y p450OCRAR y las condiciones descritas en el apartado 3.2.2 de la sección Materiales y Métodos, se consiguió amplificar un fragmento de 58 pb en distintas cepas de *A. steynii*. Este fragmento se clonó utilizando el *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* (Invitrogen, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit es ampliamente utilizado para la clonación directa de productos frescos de PCR gracias al residuo de desoxitimidina del vector pCR®4-TOPO que hace que se ligue eficazmente al producto de PCR por el residuo de desoxiadenosina que añaden las Taq polimerasas en el extremo 3' de los mismos. Posteriormente, con el plásmido que portaba el fragmento de interés se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* DH5α (TOPO10 One Shot®). La selección de transformantes se llevó a cabo en placas de medio LB (Pronadisa, España) suplementado con Ampicilina (50 µg/ml).

La presencia del inserto fue confirmada mediante PCR de las colonias obtenidas utilizando los cebadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse suministrados en el kit y siguiendo el protocolo de amplificación descrito por el fabricante.

#### 6.3.1.2.- AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

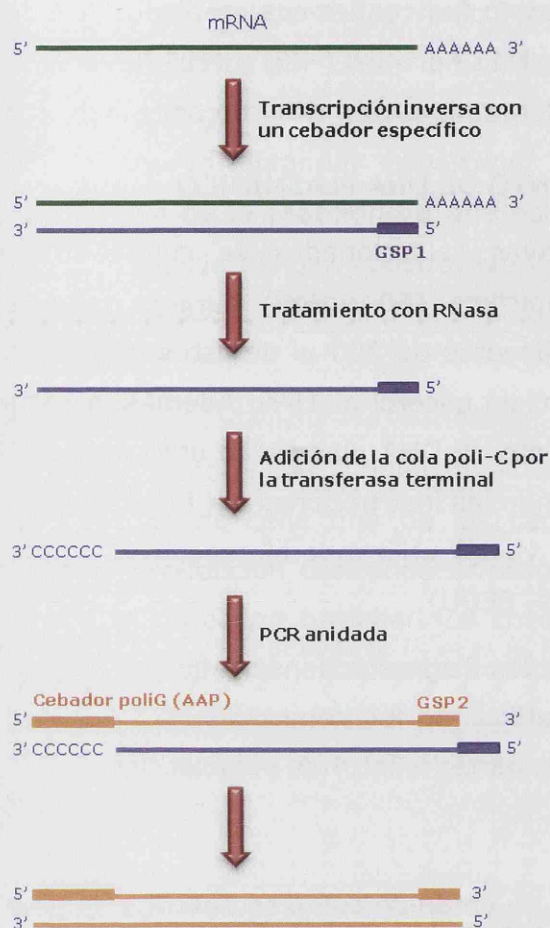
Las colonias positivas seleccionadas se cultivaron en tubos de caldo LB suplementado con Ampicilina (50 µg/ml) durante toda la noche a 37 °C con agitación (200 rpm). Alícuotas de 200 µl de estos cultivos de alta densidad celular se conservaron a -80 °C en glicerol al 15%. Además, a partir de 5 ml de cultivo se llevó a cabo el aislamiento de DNA plasmídico utilizando el kit *NucleoSpin® Plasmid* (Cultek, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA plasmídico obtenido se valoró utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU).

La secuenciación de los fragmentos insertados en el vector plasmídico se realizó en ambas direcciones utilizando los cebadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse según se describe en el apartado 3.1.4 de esta sección.

#### 6.3.1.3.- 5'-RACE

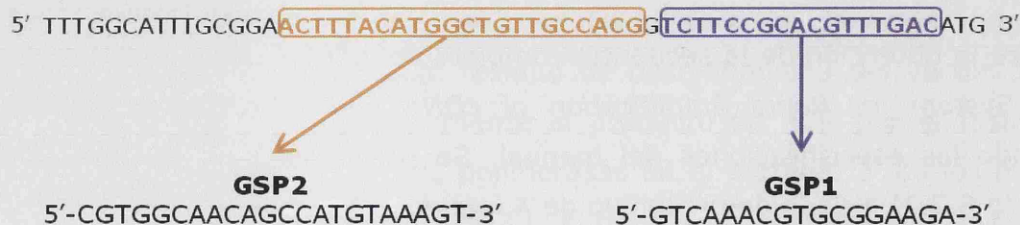
El fragmento de 58 pb obtenido como se describe anteriormente se alineó con la secuencia del gen *p450-B03* de *A. westerdijkiae* y se dedujo que se debía encontrar en el extremo 3' de un gen (*p450ste*) que codificara para una citocromo p450 monooxigenasa en *A. steynii* que podría estar implicada en la ruta de síntesis de OTA en esta especie. Por ello, se eligió la técnica denominada 5'-RACE (*Rapid Amplification of 5' complementary cDNA ends*) (Frohman *et al.*, 1989). En primer lugar y partiendo del RNA total, se realiza la retrotranscripción usando un cebador específico del fragmento (GSP1). Posteriormente, se produce la adición de una cola homopolimérica de citosinas usando una transferasa terminal y, por último, se amplifica el cDNA de interés usando un cebador específico (GSP2) y otro complementario a la cola homopolimérica añadida. En la figura 2.2 se puede ver un esquema del proceso.

Para la obtención de la secuencia completa del gen se utilizó el kit comercial 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen, Reino Unido) siguiendo las especificaciones del manual. Se partió de 3 µg de RNA total (ver apartado 6.2.2) aislado de un cultivo de *A. steynii* 3.53 en medio CYA tras 5 días de incubación. La secuencia de los cebadores GSP1 y GSP2 así como su posición relativa en la secuencia de 58 pb de la que se partió se muestran en la figura 2.3.



**Figura 2.2.** Representación esquemática del protocolo típico de la técnica 5'-RACE.

El programa utilizado para la PCR anidada llevada a cabo con los cebadores AAP y GSP2 se componía de un paso inicial de 5 min a 94 °C, 30 ciclos de 45 s a 94 °C (desnaturalización), 45 s a 64 °C (hibridación) y 2 min a 72 °C (extensión), y un ciclo final de 7 min a 72 °C.



**Figura 2.3.** Cebadores GSP1 y GPS2 utilizados en la técnica de 5'-RACE para la obtención de la secuencia completa del gen *p450ste* de *A. steynii*.

#### 6.3.1.4.- EXTRACCIÓN Y CLONAJE DE BANDAS DE DNA DE GELES DE AGAROSA

Para la purificación del gel de la banda mayoritaria obtenida tras la técnica 5'-RACE se utilizó el *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAgen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. El clonaje de la banda extraída se realizó utilizando el sistema pGEM®-T Easy Vector II (Promega Biotech, España) siguiendo los pasos indicados en el protocolo recomendado. En este caso, el inserto se unió al vector pGEM®-T Easy utilizando la enzima DNA ligasa del fago T4. Posteriormente, se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* JM109 y la selección de transformantes se realizó en placas de medio LB (Pronadisa, España) suplementado con Ampicilina (50 µg/ml) donde se extendieron 100 µl de IPTG 100 mM y 50 µl de X-Gal 20 mg/ml (Sambrook & Russel, 2001).

La presencia del inserto fue confirmada mediante PCR de las colonias blancas obtenidas utilizando los cebadores universales SP6 y T7 y el protocolo de amplificación descrito en Sambrook & Russel (2001).

Una vez seleccionados los clones que tenían el vector donde estaba insertado el fragmento de interés se procedió a la extracción de DNA plasmídico y a la secuenciación del fragmento con los cebadores SP6 y T7 tal y como se describe en el apartado 6.3.1.2.

#### 6.3.2.- Estudio de otros genes implicados en la síntesis de ocratoxina A en *A. steynii*

Se llevaron a cabo ensayos de PCR convencional utilizando DNA de *A. steynii*, y cebadores previamente descritos basados en genes que codifican para genes implicados en la síntesis de OTA en otras especies.

En el apartado 6.1 de Materiales y Métodos se describe la secuencia de los cebadores y las condiciones empleadas para la amplificación de el gen *pks* descrito por O'Callaghan *et al.* (2003).

En el caso de la amplificación del gen *aoks1* descrito por Bacha *et al.* (2009) se utilizaron los cebadores Aoks1 y Aoks1R utilizados por los autores y que amplifican un fragmento de 1100 pb en *A. westerdijkiae*. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, 33 ciclos de 45 s a 95 °C, 1 min a 61 °C y 2 min a 72 °C, terminando con una extensión final de 7 min a 72 °C.

Geisen *et al.* (2006) describieron un gen de 951 pb en *P. nordicum* que codificaba para una enzima cloroperoxidasa y cuyos niveles de expresión se correlacionaban con la producción de OTA por el hongo. A partir de esa secuencia se



diseñaron los cebadores otachl-F (5'-ATCGGGATCGGGTAGACGAAGAA -3') y otachl-R (5'-CCTTATCGCCGCTGGTATTCT -3') que amplificaban una región de 500 pb de este gen y se ensayaron con las siguientes condiciones de amplificación: 5 min de desnaturalización inicial a 95 °C, 30 ciclos de 45 min a 95 °C, 1 min a 53 °C y 2 min a 72 °C y, finalmente, 10 min a 72 °C.

Si en las reacciones de PCR convencional se obtuvo una única banda cuando se realizaba la amplificación de DNA de *A. steynii* se llevo a cabo el clonaje de los fragmentos amplificados y su posterior secuenciación tal y como se describió en el apartado 6.3.1.1 de esta sección. En el caso de que se obtuviera más de una banda se procedió a su extracción del gel y a su clonaje y secuenciación como se describe en el apartado 6.3.1.4 de Materiales y Métodos.

Si al comparar las secuencias con las de las bases de datos se obtenía una elevada identidad con genes que tuvieran funciones relacionadas con la ruta de síntesis de OTA se diseñaron cebadores para PCR a tiempo real y se llevó a cabo el análisis de la expresión génica siguiendo el mismo protocolo descrito para *A. westerdijkiae* (apartado 6.2 de la sección Materiales y Métodos). Las secuencias de estos cebadores se detallan en el correspondiente apartado de la sección Resultados. Asimismo, en los casos donde se encontraron problemas para la amplificación de fragmentos pequeños para PCR a tiempo real se analizó la estructura secundaria de la secuencia de los genes mediante el programa MFOLD® 3.5 (Universidad de Washington, EEUU).

Los ensayos de PCR a tiempo real se realizaron a partir de cultivos de dos cepas productoras de *A. steynii*, 3.53 y Aso2, así como con una cepa no productora, CBS 112813. Los protocolos de cultivo, extracción de RNA, síntesis de cDNA y análisis de la expresión génica así como el estudio estadístico, coinciden con los realizados en el caso de *A. westerdijkiae* y se detallan en el apartado 6.2 de esta sección.

## **7. CONTROL BIOLÓGICO DE *A. westerdijkiae* CON LEVADURAS. ESTUDIO DE *D. hansenii* CYC 1244 COMO UN POSIBLE AGENTE DE BIOCONTROL**

### **7.1.- SELECCIÓN DE CANDIDATOS A AGENTES BIOCONTROL FRENTE A *A. westerdijkiae***

Las 16 cepas de levaduras que se probaron como posibles agentes de control biológico frente a *A. westerdijkiae* en ensayos en placa se muestran en la tabla 2.4.

ESPECIE	CEPA	DE DONDE
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CYC 1021	Salmuera de aceituna
	CYC 1244	Almíbar de pera
	CECT 10380	Higo
	CECT 10386	Ciruela
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CYC 1172	Zumo de naranja
	CYC 1174	Zumo de naranja
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CYC 1176	Yogur natural
	CYC 1177	Yogur de frutas
	CECT 10589	Mosto de uva
	CECT 10676	Uva
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	L3	Manzana
	L4	Manzana
	L4.1	Manzana
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CYC 1150	Concentrado de almidón
<i>Pichia anomala</i>	CECT 1114	Desconocido
<i>Pichia membranifaciens</i>	CYC 1070	Salmuera de aceituna

**Tabla 2.4.** Cepas de levadura utilizadas en el ensayo inicial de biocontrol frente a *A. westerdijkiae*. Se muestra la especie a la que pertenecen y de donde fueron aisladas. CYC= *Complutense yeast collection*; CECT= Colección española de cultivos tipo.

El ensayo inicial se llevó a cabo en placas de medio YMA-MB (YMA con 0,5 mg/l de azul de metileno) suplementado con un 6% de cloruro sódico a pH 4,5 tamponado con 0,2 M de tampón citrato/fosfato. Se prepararon suspensiones de esporas ( $10^4$  esporas/ml) (ver apartado 2 de Materiales y Métodos) de 4 cepas de *A. westerdijkiae* (CECT 2948, ALF, CCT 6795 y CCT 6825) y 1 ml de las mismas se sembró en superficie en las placas del medio citado. Se dejaron secar en la campana de flujo laminar y, posteriormente, se colocó en la superficie el contenido de un asa de siembra de un cultivo sólido de cada una de las levaduras (4 levaduras por placa). Las placas se incubaron a 20 °C y se consideró biocontrol positivo cuando aparecía un claro halo de inhibición del crecimiento del hongo alrededor de la levadura tras 7 días de incubación.

Posteriormente, se estudió en profundidad el efecto sobre el crecimiento del hongo y/o de la producción de OTA debida a la presencia de las levaduras con las cepas que mostraron un efecto de biocontrol del hongo en el ensayo anterior.

#### 7.1.1.- Efecto de la temperatura sobre la actividad del posible agente biocontrol

1 ml de una suspensión celular de las levaduras seleccionadas ( $5 \times 10^4$  células/ml) se mezcló con 25 ml de medio CYA fundido y se sembró en el centro de cada placa 2  $\mu$ l de suspensión de esporas de *A. westerdijkiae* ( $10^7$  esporas/ml), CECT 2948, ALF, CCT 6795 y CCT 6825. La incubación se llevó a cabo a 20 y 28 °C y el crecimiento del hongo se valoró midiendo el diámetro de la colonia tras 10 días de incubación.

La influencia de estas levaduras en los niveles de OTA a las distintas temperaturas se comprobó en placas de medio CYA donde se sembraron cepas productoras de *A. westerdijkiae*, CECT 2948 y CCT 6795. La OTA se determinó como se describe en los apartados 4.2 y 4.3 de la sección Materiales y Métodos.

Este ensayo realizado a las distintas temperaturas, se repitió con la cepa de levadura que mostró una mayor actividad de biocontrol frente a *A. westerdijkiae*, realizando tres réplicas de cada una de las condiciones.

#### 7.1.2.- Efecto de la salinidad sobre la actividad antagonista de *D. hansenii* CYC 1244

El efecto en la inhibición del crecimiento de *A. westerdijkiae* debido a la presencia de *D. hansenii* CYC 1244 al incrementar la concentración de sal en el medio se estudió utilizando placas que contenían 1 ml de una suspensión celular de cada levadura ( $5 \times 10^5$  células/ml) con 25 ml de medio fundido YMA-MB suplementado o no con un 6% de cloruro sódico. En el centro de cada placa, se sembraron 2  $\mu$ l de una suspensión ( $10^7$  esporas/ml) de cada una de las 4 cepas de *A. westerdijkiae* que se citaron anteriormente y las placas se incubaron a 20 °C. El crecimiento fúngico se determinó midiendo el diámetro de la colonia a los 10 días de incubación. Se realizaron tres réplicas de cada una de las condiciones.

#### 7.1.3.- Análisis estadístico

Posteriormente, se procedió al estudio estadístico de los datos para comprobar el efecto de la presencia de *D. hansenii* CYC 1244 sobre el crecimiento de *A. westerdijkiae* en cada una de las condiciones de temperatura y salinidad mencionadas utilizando el programa SAS® 9.1 (SAS Institute Inc., EEUU). Tras comprobar su homocedasticidad y que los datos seguían una distribución normal, se utilizó un test ANOVA y se estableció el nivel de significación en  $p \leq 0,05$ .

## 7.2.- ENSAYOS DE BIOCONTROL EN UVAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS

Los ensayos para comprobar la actividad antagonista de *D. hansenii* CYC 1244 se realizaron en un producto comúnmente contaminado por *A. westerdijkiae* como son las uvas blancas (variedad Vinalopó, España). Se eligieron unidades en perfecto estado y se descontaminaron superficialmente mediante inmersión en etanol absoluto durante 5 min seguida de un aclarado en agua destilada estéril. Se dejaron secar al aire y posteriormente se les realizó una incisión de 5 mm con un bisturí. Se realizaron 4 grupos diferentes que se inocularon siguiendo el protocolo que se detalla en la tabla 2.5. El ensayo se llevo a cabo con 4 cepas de *A. westerdijkiae*, CECT 2948, ALF, CCT 6795, CCT 6825. La incubación se realizó a 28 °C durante 15 días.

Grupo	Inoculación 1	Inoculación 2
1.- Control hongo	8 µl suero salino estéril	8 µl <i>A. westerdijkiae</i> (10 <sup>5</sup> esporas/ml)
2.- Hongo + Levadura	8 µl <i>D. hansenii</i> (10 <sup>7</sup> células/ml)	8 µl <i>A. westerdijkiae</i> (10 <sup>5</sup> esporas/ml)
3.- Control Levadura	8 µl <i>D. hansenii</i> (10 <sup>7</sup> células/ml)	8 µl suero salino estéril
4.- Control no contaminado	8 µl suero salino estéril	8 µl suero salino estéril

**Tabla 2.5.** Protocolo de inoculación de los distintos grupos de uvas en los ensayos de actividad biocontrol de *D. hansenii* frente a *A. westerdijkiae*. Entre la primera inoculación y la segunda las uvas se mantuvieron durante 2 horas en una campana de flujo laminar. Se inocularon 3 uvas por cada condición.

Tras el periodo de incubación se unieron las tres réplicas de cada tratamiento y se homogeneizaron y pulverizaron con nitrógeno líquido y un mortero de cerámica. Se llevó a cabo la extracción de DNA genómico con el *DNeasy Plant Maxi Kit* (QIAGEN, España) siguiendo las instrucciones del fabricante excepto por la adición de PVP en el buffer AP2. La cantidad de DNA de *A. westerdijkiae* se cuantificó utilizando el método de PCR a tiempo real específico diseñado según se detalla en el apartado 3.2.4 de esta sección partiendo de 400 ng de DNA total por reacción.

### 7.3.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LA TOXINA *killer* DE *D. hansenii* CYC 1244 FRENTE A *A. westerdijkiae*

La toxina *killer* purificada fue proporcionada por el Dr. Antonio Santos (Departamento de Microbiología III, Universidad Complutense de Madrid).

El ensayo para valorar la acción de la toxina *killer* purificada de *D. hansenii* CYC 1244 se realizó en medio YMA-MB suplementado y no suplementado con un 6% de cloruro sódico. Para ello, se extendió en la superficie de las placas 1 ml de una suspensión de esporas de *A. westerdijkiae* ( $10^4$  esporas/ml), CECT 2948, ALF, CCT 6795 y CCT 6825. 20  $\mu$ l del extracto purificado de toxina *killer* de la levadura de estudio fue depositado en el centro de la placa sobre un disco de 6 mm de diámetro de papel de filtro (Whatman Nº 1). Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 2 h para permitir la difusión de la toxina y posteriormente se incubaron durante 7 días a 20 °C. Se consideró actividad *killer* positiva cuando apareció un halo de inhibición del crecimiento. Como control de la correcta actividad de la toxina *killer*, se realizó el mismo ensayo con una suspensión celular de la levadura sensible *Candida boidinii* CYC 1025.

### 7.4.- ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REDUCCIÓN DE OCRATOXINA A POR *D. hansenii* CYC 1244

#### 7.4.1.- Efecto sobre la expresión de genes implicados en la síntesis de ocratoxina A en *A. westerdijkiae*

Para comprobar si *A. westerdijkiae* disminuía la producción de OTA en presencia de *D. hansenii* CYC 1244 se analizó la expresión de los genes implicados en la ruta de síntesis de la toxina. Los ensayos se realizaron en placas de medio CYA en el cual se incluyó 1 ml de una suspensión celular de la levadura ( $5 \times 10^4$  células/ml). Antes de depositar 2  $\mu$ l de suspensión de esporas del hongo ( $10^7$  esporas/ml) (cepas CECT 2948 y AOPD16-1), se colocó un celofán estéril (P400, Cunnings Ltd, Reino Unido) para facilitar la retirada del micelio tras la incubación. Además se realizó el mismo protocolo con placas de medio CYA sin levadura.

Las placas se mantuvieron a 28 °C y se fueron procesando después de su incubación entre 3 y 7 días en estas condiciones. La valoración de la concentración de OTA en el medio se realizó como se describe en los apartados 4.2 y 4.3 de Materiales y Métodos.

El protocolo que se siguió para la extracción de RNA fúngico y la síntesis de cDNA se detallan en los apartados 6.2.2 y 6.2.3 de esta sección. La valoración de la

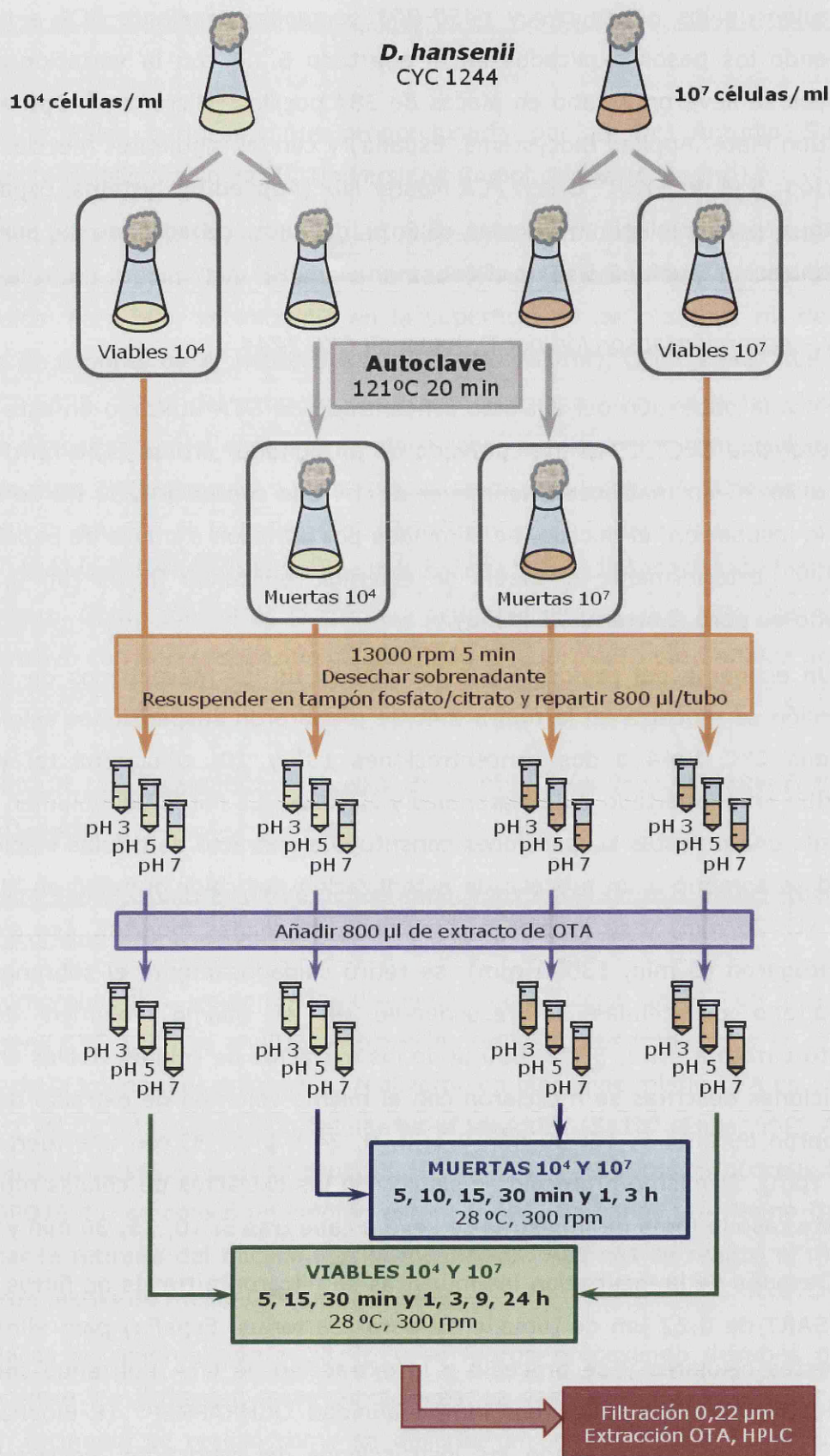
expresión de los genes *pks* y *p450-B03* se realizó mediante PCR a tiempo real siguiendo los pasos explicados en el apartado 6.2.4 con la variación de que los ensayos se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, España) y con las siguientes mezclas para cada reacción: 5 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, España), 1,3 µl de agua para biología molecular, 0,6 µl de cada cebador de la pareja a una concentración 5 µM y 2,5 µl de cDNA.

#### 7.4.2.- Adsorción/absorción por *D. hansenii* CYC 1244

Para la obtención del extracto concentrado de OTA utilizado en este ensayo *A. westerdijkiae* CECT 2948 fue cultivado en un agitador orbital (120 rpm) durante 7 días a 28 °C en matraces Erlenmeyer de 1 l que contenían 250 ml de caldo YES. Tras la incubación, el micelio fue eliminado por filtración a través de papel Whatman Nº 1 y posteriormente el medio se esterilizó utilizando filtros con 0,22 µm de tamaño de poro (Sartorius, España).

Un esquema del protocolo para el estudio de los mecanismos de adsorción y absorción se muestra en la figura 2.4. Se prepararon suspensiones celulares de *D. hansenii* CYC 1244 a dos concentraciones  $10^4$  y  $10^7$  células/ml tal y como se describe en el apartado 2 de Materiales y Métodos. La mitad del volumen preparado de cada una de estas suspensiones constituyó el extracto de células viables. La otra mitad se sometió a un proceso de esterilización por calor húmedo en el autoclave (121 °C, 20 min) y se consideró el extracto de células muertas. Los extractos se centrifugaron (5 min, 13000 rpm), se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió en el mismo volumen de tampón fosfato/citrato a pH 3, 5 y 7. 800 µl de los extractos de células viables en todas las condiciones descritas se mezclaron con el mismo volumen de extracto de OTA y se incubaron durante 5, 15, 30 min y 1, 3, 9, 24 h a 28 °C con una fuerte agitación (300 rpm). El mismo protocolo se siguió con los extractos de células muertas pero en este caso la toma de muestras se llevó a cabo tras 5, 10, 15, 30 min y 1, 3 h.

Después de la incubación las muestras se filtraron a través de filtros de jeringa MINISART de 0,22 µm de tamaño de poro (Sartorius, España) para eliminar todos los restos celulares y se procedió a la extracción de OTA utilizando columnas de purificación en fase sólida por inmunoafinidad OCHRAPREP® (R-Biopharm Rhône LTD, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se procedió a la medida de la concentración en el extracto purificado mediante HPLC como se describe en el apartado 4.3 de la sección Materiales y Métodos.



**Figura 2.4.** Esquema del protocolo utilizado en el ensayo para comprobar la posible adsorción a su pared o absorción al interior de OTA por parte de *D. hansenii* CYC 1244.

#### 7.4.3.- Degradación de ocratoxina A por *D. hansenii* CYC 1244

*D. hansenii* CYC 1244 se cultivó en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio YMB durante 72 h a 27 °C en un agitador orbital (120 rpm). Tras ello se retiró la masa celular mediante filtrado utilizando membranas de tamaño de poro de 0,22 µm. Se repitió el proceso 3 veces para asegurar la total eliminación de las levaduras. 10 ml del filtrado se juntaron con 10 ml de extracto de OTA (ver preparación en el apartado 7.4.2) y se mantuvieron en un matraz con una agitación leve (100 rpm) a 28 °C durante 24 y 48 h. Posteriormente se procedió a la extracción de OTA (apartado 7.4.2) y a la medida de la concentración de OTA por HPLC. Como control se realizó el mismo protocolo mezclando 10 ml de extracto de OTA con 10 ml de medio YMB sin inocular. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Además se estudiaron los cromatogramas del ensayo explicado en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos para comprobar la posible aparición de OTA-α, el producto más frecuente de degradación de la OTA (Abrunhosa *et al* , 2002).

#### 7.4.4.- Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se procesaron utilizando los correspondientes test estadísticos con el programa SPSS 14.0 (IBM-SPSS, EEUU). En el caso del estudio de la posible absorción u absorción de la OTA por parte de la levadura se comprobó la normalidad y la homogeneidad de las varianzas con los test de Shapiro-Wilk y Levene y posteriormente se aplicaron test ANOVA bifactoriales para todos los parámetros estudiados. En el caso del estudio de la posible degradación de la toxina, las variables no cumplían el criterio de homocedasticidad de varianzas, por lo que se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para comparar los datos del control con los valores obtenidos tras la incubación de los extractos. Para todos los test se estableció un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ .





Resultados



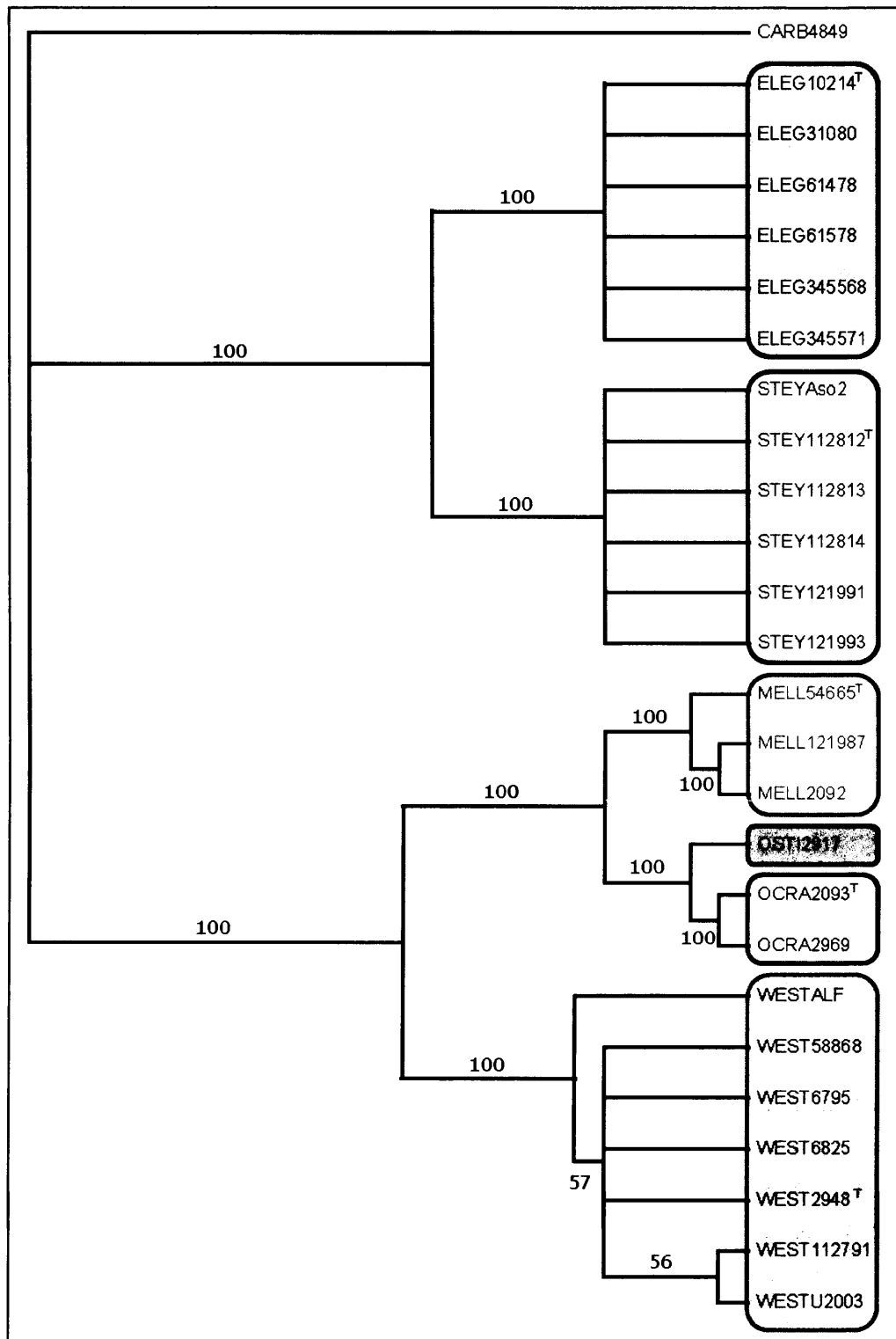
## **1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI**

Las secuencias del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina (*Btub*) y la región ITS1-5,8S-ITS2 que se obtuvieron como se detalla en el apartado 3.1.4 de la sección Materiales y Métodos, se utilizaron para la construcción de un árbol filogenético mediante análisis de parsimonia. El árbol consenso obtenido por máxima parsimonia de la combinación de las secuencias de ambas regiones se muestra en la figura 3.1. El programa señaló el uso de 120 nucleótidos filogenéticamente informativos para la realización del árbol y un índice de consistencia de 0,91 que refleja la baja homoplasia o falta de evolución convergente en estas secuencias.

Se puede observar como cada una de las especies de la sección Circumdati ocupa una rama independiente en el árbol y cada uno de estos grupos se encuentra apoyado por valores de *bootstrap* de 100. Sin embargo, la cepa tipo de *A. melleus* se separa en una rama independiente del resto de cepas de esta especie identificadas mediante su comparación con las secuencias pre-existentes en la base de datos del NCBI. La rama formada por las cepas de *A. westerdijkiae* analizadas, presenta algunas ramificaciones secundarias pero con baja consistencia ya que están apoyadas por valores de *bootstrap* cercanos al 50%.

## **2. ENSAYOS DE PCR ESPECÍFICOS PARA LA DISCRIMINACIÓN DE LAS PRINCIPALES ESPECIES OCRATOXÍGENAS DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI**

El diseño de los cebadores específicos utilizados se llevó a cabo partiendo de alineamientos de la región ITS1-5,8S-ITS2 tal y como se describe en el apartado 3.1.5 de la sección Materiales y Métodos. El número de secuencias disponibles en la base de datos de esta región correspondientes a las nuevas especies era muy bajo debido a que se disponía de muy pocos trabajos publicados hasta el momento. Por tanto, se secuenció la región ITS1-5,8S-ITS2 en una gran variedad de aislamientos de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* así como de otras especies de la sección Circumdati. Estas secuencias se depositaron en la base de datos del EMBL y los números de acceso de las mismas se reflejan en la tabla 3.1.



**Figura 3.1.** Árbol consenso obtenido por máxima parsimonia de la combinación de las secuencias del gen *βtub* y de la región ITS1-5,8S-ITS2. Los números indicados encima de las ramificaciones se corresponden con los valores de *bootstrap* para cada una de ellas. Los nombres de los aislamientos se corresponden con el código de la cepa y las iniciales de la especie: CARB=*A. carbonarius*, ELEG=*A. elegans*, MELL=*A. melleus*, OCRA=*A. ochraceus*, OSTI=*A. ostianus*, STEY=*A. steynii*, WEST=*A. westerdijkiae*. El superíndice (<sup>T</sup>) indica cual es la cepa tipo de la especie.

La secuencia de los cebadores específicos para *A. steynii*, *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* diseñados a partir de los alineamientos de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de una gran variedad de cepas y los programas de amplificación utilizados con cada una de las parejas se detallan en apartados 3.1.5 y 3.1.6 de Materiales y Métodos.

La especificidad de los ensayos diseñados fue probada en DNA aislado de una gran variedad de cepas fúngicas de distintas especies cercanas filogenéticamente como *A. elegans*, *A. melleus* o *A. sclerotiorum*, incluidas dentro de la sección *Circumdati*, así como de otros importantes *Aspergillus* toxígenos como *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. flavus* o *A. parasiticus*. Además, se valoró el ensayo utilizando DNA de especies de otros géneros que habitualmente contaminan los mismos productos como *Fusarium verticillioides* o *Penicillium verrucosum*. Todas las cepas probadas, junto con su origen, se encuentran detalladas en la tabla 3.1.

Cepa	Especie	Origen	Btub	ITS1-5,8S-ITS2
IMI 239398	<i>A. alliaceus</i> <sup>(2)</sup>	Suelo, Qatar	FN185734	FN295955
168 <sup>b</sup>	<i>A. carbonarius</i>	Uvas, España	-	-
173 <sup>b</sup>	<i>A. carbonarius</i>	Uvas, España	-	-
325 <sup>b</sup>	<i>A. carbonarius</i>	Uvas, España	-	-
CBS 102.14 <sup>T</sup>	<i>A. elegans</i>	-	A	FM201284
CBS 310.80	<i>A. elegans</i>	-	FM995520	FM201285
CBS 614.78	<i>A. elegans</i>	-	FM995521	FM201286
CBS 615.78	<i>A. elegans</i>	-	FM995522	FM201287
IMI 345568	<i>A. elegans</i>	-	FM995523	FM956459
IMI 345571	<i>A. elegans</i>	-	FM995524	FM956460
ITEM 4592	<i>A. flavus</i>	Trigo, Francia	-	-
M12hip10 <sup>c</sup>	<i>A. flavus</i>	Cebada, España	-	-
ITEM 4685	<i>A. japonicus</i>	Uvas, Portugal	-	-
CBS 121987	<i>A. melleus</i>	Café, Tailandia	FM995526	FM986320
CBS 546.65 <sup>T</sup>	<i>A. melleus</i>	Suelo, India	A	FM986321
CECT 2092	<i>A. melleus</i> <sup>(1)</sup>	-	FM995525	FM986318
B.Me.A26	<i>A. niger</i>	Uvas, España	-	-
CECT 2091	<i>A. niger</i>	Suelo, Canadá	-	-
CECT 2093 <sup>T</sup>	<i>A. ochraceus</i>	-	FM995527	A
CECT 2969	<i>A. ochraceus</i>	-	FM995528	FM956457
CECT 2970	<i>A. ochraceus</i>	-	-	-
PDF2-1 <sup>b</sup>	<i>A. ochraceus</i>	Pimentón dulce ahumado, España	-	-
PP2-5 <sup>b</sup>	<i>A. ochraceus</i>	Pimentón picante, España	-	-
PP2-9 <sup>b</sup>	<i>A. ochraceus</i>	Pimentón picante, España	-	-
PP8 <sup>b</sup>	<i>A. ochraceus</i>	Pimentón picante, España	-	-
R1	<i>A. ochraceus</i>	Romero, Albania	-	-
CECT 2917	<i>A. ostianus</i> <sup>(1)</sup>	Judía roja, Canadá	FM995529	FM986319
CECT 2680	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-
CECT 2681	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-

Cepa	Especie	Origen	<i>Btub</i>	ITS1-5,8S-ITS2
CECT 2546	<i>A. sclerotiorum</i>	-	-	-
3.53 <sup>b</sup>	<i>A. steynii</i>	Café verde, desconocido	-	-
Aso2 <sup>c</sup>	<i>A. steynii</i> <sup>(1)</sup>	Uvas, España	FN185738	FM956458
CBS 112812 <sup>T</sup>	<i>A. steynii</i>	Café India	A	FM201289
CBS 112813	<i>A. steynii</i>	-	FN185735	FM201290
CBS 112814	<i>A. steynii</i>	Café, India	A	FM201291
CBS 121991	<i>A. steynii</i>	Café, Tailandia	FN185736	FM201292
CBS 121993	<i>A. steynii</i>	Café, Tailandia	FN185737	FM201288
Bo56 <sup>c</sup>	<i>A. tubingensis</i>	Uvas, España	-	-
Bo66 <sup>c</sup>	<i>A. tubingensis</i>	Uvas, España	-	-
3.38 <sup>b</sup>	<i>A. westerdijkiae</i>	Ambiente, España	-	-
3.58 <sup>b</sup>	<i>A. westerdijkiae</i>	Uvas, Italia	-	-
3.66 <sup>b</sup>	<i>A. westerdijkiae</i>	Uvas, España	-	-
ALF <sup>a</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	-	FN185742	FM986325
ALM <sup>a</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	-	-	-
CBS 112791	<i>A. westerdijkiae</i>	-	A	FM986322
CBS 121986	<i>A. westerdijkiae</i>	Café, Tailandia	-	-
CBS 263.67	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Sorgo, Sudáfrica	-	-
CBS 588.68	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Pimienta, EEUU	FN185743	FM986326
CBS 589.68	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Pimienta, EEUU	-	-
CCT 6780 <sup>a</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Café, Brasil	-	-
CCT 6790 <sup>a</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Café, Brasil	-	-
CCT 6795 <sup>a</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Café, Brasil	FN185740	FM956456
CCT 6810 <sup>a</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Café, Brasil	-	-
CCT 6825 <sup>a</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Café, Brasil	FN185741	FM986324
CECT 2948 <sup>T</sup>	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Sorgo, Sudáfrica	FN185739	FM956455
D5 <sup>b</sup>	<i>A. westerdijkiae</i>	Pastel, España	-	-
PCH1 <sup>b</sup>	<i>A. westerdijkiae</i>	Pistacho, España	-	-
PDF1 <sup>b</sup>	<i>A. westerdijkiae</i>	Pimentón dulce ahumado, España	-	-
U2003	<i>A. westerdijkiae</i> <sup>(1)</sup>	Uvas, España	FN185744	FM986323
FvMM1-2	<i>F. verticillioides</i>	Maíz, España	-	-
CECT 2906	<i>P. verrucosum</i>	-	-	-

**Tabla 3.1.** Aislamientos utilizados en la puesta a punto de los métodos de PCR diseñados. Se indican el nombre de las cepas, las especies a las que pertenecen y el sustrato del que se aislaron. Además, se muestran los números de acceso en la base de datos del EMBL de las secuencias del gen *Btub* y de la región ITS1-5,8S-ITS2 que se obtuvieron durante este trabajo. Los aislamientos marcados con un número estaban clasificados previamente como *A. ochraceus*<sup>(1)</sup> o *A. elegans*<sup>(2)</sup> y ahora han sido reclasificados.

(A) Secuencias previamente disponibles en las bases de datos.

Cepas proporcionadas por el Dr. L. Niessen (Universidad de Múnich, Alemania) (<sup>a</sup>), Dr. V. Sanchis (Universidad de Lleida, España) (<sup>b</sup>) y Dra. M. Jiménez (Universidad de Valencia, España) (<sup>c</sup>). El superíndice (<sup>T</sup>) indica que el aislamiento se corresponde con la cepa tipo de la especie a la que pertenece.

CBS=Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda)

CCT= Coleção de Culturas Tropical (Brasil)

CECT=Colección Española de Cultivos Tipo (España)

IMI=CABI Genetic Resource Collection (Reino Unido)

ITEM=Institute of Sciences of Food Production Culture Collection (Italia)

La calidad del DNA para ser amplificado por PCR fue comprobada en todos los aislamientos mediante PCR con la pareja de cebadores ITS1/ITS4 donde se obtuvo, en cada caso, una única banda de amplificación del tamaño esperado.

Los cebadores STEYF y STEYR, utilizando el programa diseñado, amplificaban una única banda de 315 pb solo en el caso de que se estuviera utilizando DNA de *A. steynii* (Figura 3.2).

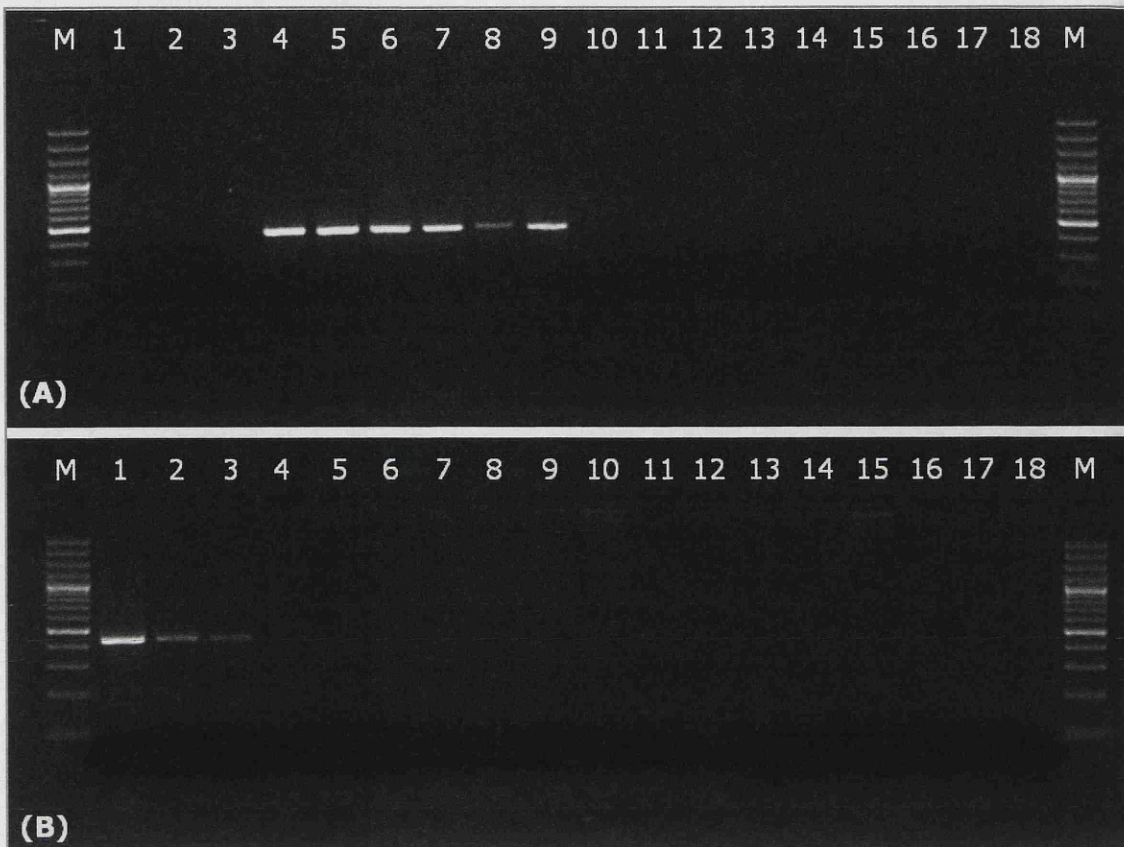


**Figura 3.2.** Amplificación por PCR utilizando los cebadores STEYF/STEYR y DNA de diferentes aislamientos. Carriles 1-5: *A. steynii* CBS 112812, CBS 112814, CBS 121991, CBS 121993, Aso2; carriles 6-10: *A. elegans* CBS 102.14, CBS 310.80, CBS 614.78, IMI 345568, IMI 345571; carril 11: *A. melleus* CECT 2092; carril 12: *A. ochraceus* CECT 2093; carril 13: *A. westerdijkiae* CCT 6795; carril 14: *A. sclerotiorum* CECT 2546; carril 15: *A. flavus* ITEM 4592; carril 16: *A. carbonarius* 325; carril 17: *F. verticillioides* FvMM1-2; carril 18: control negativo. M: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder.

De manera similar, se llevó a cabo la amplificación con DNA de todos los aislamientos recogidos en la tabla 3.1 utilizando las parejas cebadores WESTF/WESTR y OCRAF/OCRAR con los programas adecuados (Figura 3.3). En los dos casos se obtenía un solo fragmento de 430 pb únicamente cuando se usaba DNA de *A. westerdijkiae* o *A. ochraceus*, respectivamente.

En la mayoría de los casos en los que los resultados obtenidos mediante PCR no concordaban con la identificación que previamente se había hecho de los aislamientos, se obtuvieron las secuencias parciales del gen *Btub*. Todas las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del EMBL y los números de acceso asignados se muestran en la tabla 3.1. Al comparar estas secuencias con otras previamente disponibles mediante la herramienta BLAST del NCBI se confirmó, en todos los casos, la clasificación de la cepa obtenida mediante el protocolo de PCR diseñado. Todas las cepas que fueron re-clasificadas se indican en la tabla 3.1.



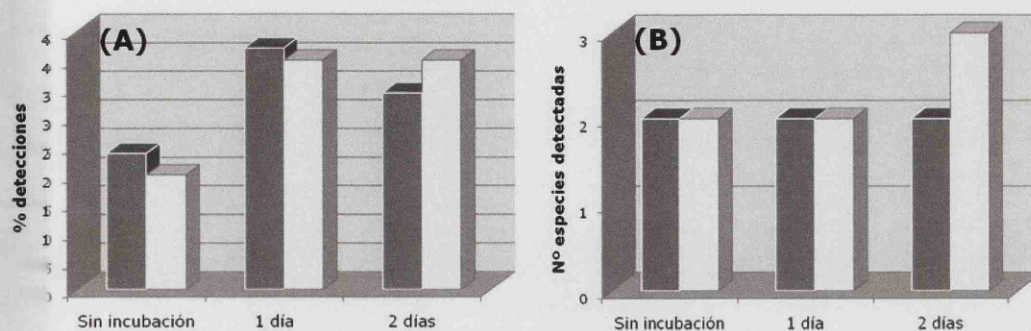


**Figura 3.3.** Ensayos de PCR usando las parejas de cebadores WESTF/WESTR (A) y OCRAF/OCRAR (B) y DNA de diferentes cepas. Carriles 1-3: *A. ochraceus* CECT 2093, CECT 2969, CECT 2970; carriles 4-9: *A. westerdijikiae* CBS 263.67, CBS 588.68, CECT 2948, CCT 6795, CBS 121986, U2003; carril 10: *A. elegans* CBS 102.14; carril 11: *A. steynii* CBS 112812; carril 12: *A. melleus* CBS 121987; carril 13: *A. sclerotiorum* CECT 2546; carril 14: *A. carbonarius* 325; carril 15: *A. flavus* ITEM 4592; carril 16: *A. tubingensis* Bo66; carril 17: *F. verticillioides* FvMM1-2; carril 18: control negativo. M: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder.

### 3. APLICACIÓN DE LOS ENSAYOS DE PCR DISEÑADOS PARA LA DETECCIÓN DE *A. steynii*, *A. westerdijikiae* y *A. ochraceus* EN MATRICES ALIMENTARIAS

En primer lugar, se valoró el efecto del tiempo de incubación de las muestras de harina de cebada y pimentón, en la detección de las principales especies productoras de OTA de la sección Circumdati al aplicar los ensayos de PCR diseñados.

En la figura 3.4.A se puede comprobar cómo la detección de las especies de estudio tanto en harina de cebada como en pimentón se vio incrementada de manera importante tras la incubación de las muestras durante 1 o 2 días. Mientras que para las muestras de pimentón el mayor número de detecciones de alguna de las especies analizadas se produjo tras 1 día de incubación, en el caso de las harinas de cebada fue necesario incubar 2 días para detectar más muestras positivas para *A. westerdijikiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus*.



**Figura 3.4.** Efecto del tiempo de incubación de las muestras para la detección de *A. steynii*, *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* mediante los ensayos de PCR diseñados. Las barras grises corresponden a los resultados en harinas de cebada y las blancas a las muestras de pimentón. En (A) se representa el porcentaje de muestras contaminadas por estas especies dependiendo del tiempo de incubación y en (B) se muestra el número total de especies detectadas en cada una de las condiciones.

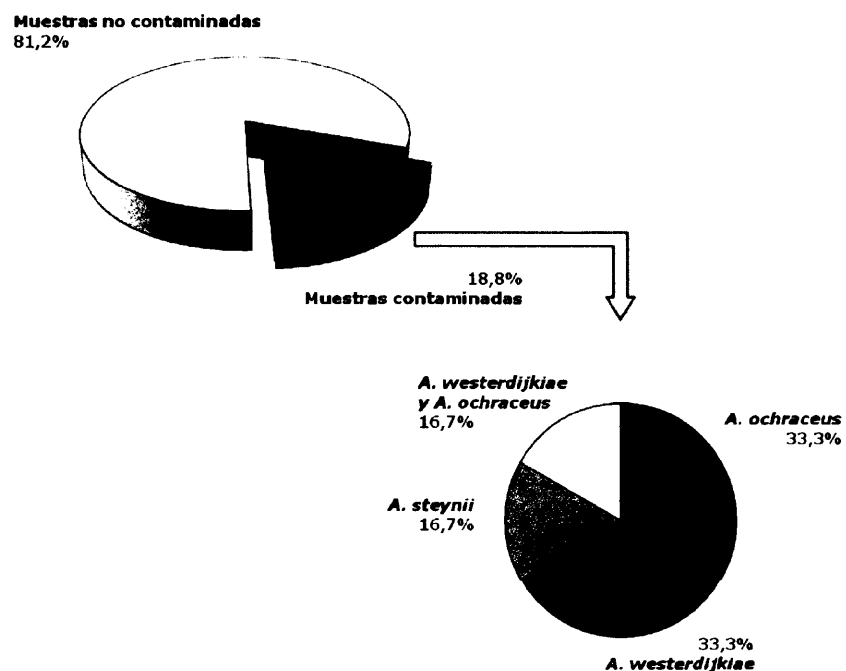
En cuanto a la diversidad encontrada en harinas de cebada, no se produjo un aumento de las especies detectadas al incrementar el tiempo de incubación (Figura 3.4.B), ya que en todos los casos únicamente se detectaron *A. ochraceus* y *A. steynii*. Sin embargo, en el caso de las muestras de pimentón, la incubación durante 2 días supuso la aparición de *A. steynii* que no se detectaba en las muestras sin incubar ni tras 1 día de incubación.

### 3.1.- DETECCIÓN EN MUESTRAS DE PIMENTÓN

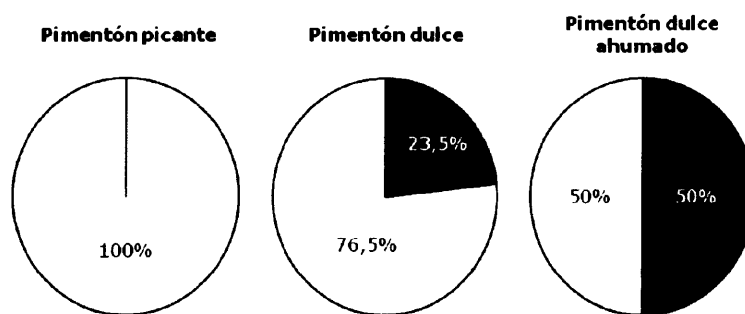
Casi un 20% de las muestras de pimentón analizadas estaba contaminada con una o varias de las especies de estudio, *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus* (Figura 3.5). Las tres especies se detectaron en alguna de las muestras y, a veces se observó que se producía la co-ocurrencia de dos de ellas. En la figura 3.5 se muestran los porcentajes relativos de detección de estas especies en las muestras contaminadas.

Las muestras de pimentón analizadas se correspondían con tres variedades diferentes: pimentón picante, dulce o dulce ahumado. Al analizar la distribución del número de muestras positivas en cada una de estas variedades se obtuvieron porcentajes muy diferentes (Figura 3.6). Mientras que en los análisis de pimentón picante no se pudieron detectar ninguna de las tres especies de estudio, en el caso del pimentón dulce se encontró un 23,5% de muestras contaminadas por alguna de ellas. El mayor porcentaje se obtuvo en pimentón dulce ahumado donde el 50% de las muestras estaban contaminadas. Hay que destacar que todas las muestras donde se detectó la co-ocurrencia de dos de las especies se correspondían con esta última variedad de pimentón.





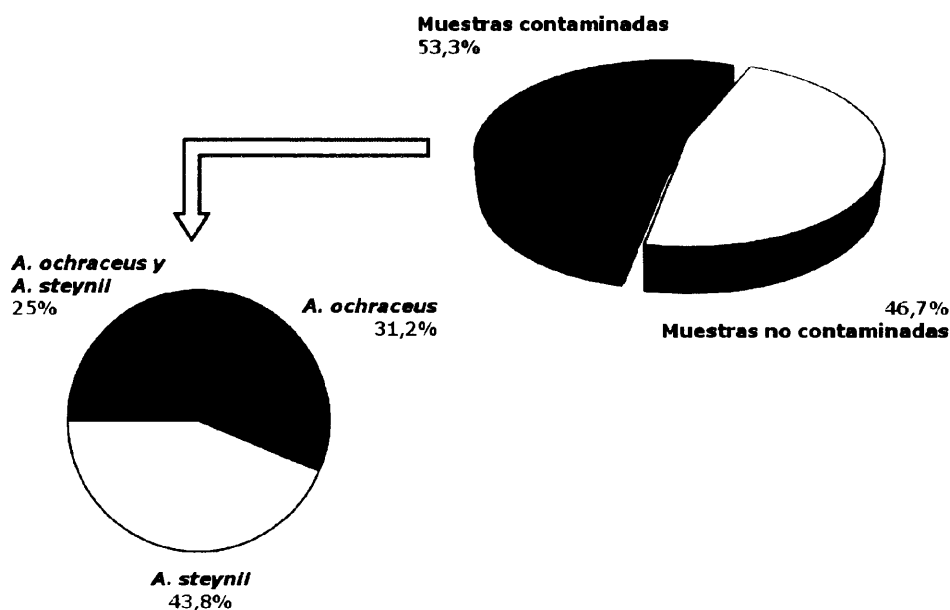
**Figura 3.5.** Detección de *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus* en el total de las muestras de pimentón analizadas. Se muestra el porcentaje de muestras contaminadas y qué especies se detectaron en las mismas.



**Figura 3.6.** Porcentaje de muestras de pimentón contaminadas en cada una de las variedades analizadas. La sección blanca de las gráficas corresponde al porcentaje de muestras donde no se pudo detectar ninguna de las especies estudiadas, mientras que la sección gris refleja las muestras contaminadas por una o varias de ellas.

### 3.2.- DETECCIÓN EN MUESTRAS DE HARINA DE CEBADA

Los análisis que se llevaron a cabo de las muestras de harina de cebada tomadas de las fábricas productoras de cerveza, revelaron que más de la mitad de las mismas (53,3%) estaban contaminadas con una o varias de las especies de estudio (Figura 3.7). Hay que destacar que *A. westerdijkiae* no se detectó en ninguna de ellas y que la especie predominante fue *A. steynii*, que aparecía en un 68% de las muestras contaminadas.



**Figura 3.7.** Detección de *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus* en el total de las muestras de harina de cebada analizadas. Se muestra el porcentaje de muestras contaminadas y qué especies se detectaron en las mismas.

En la tabla 3.2 se detalla el origen geográfico de las muestras así como los resultados de la detección de *A. steynii* y *A. ochraceus* en ellas. Se puede ver como el mayor porcentaje de muestras contaminadas (82%) se obtuvo en las procedentes de Castilla la Mancha, destacando Toledo y Ciudad Real con un 100% de las muestras contaminadas por *A. steynii*. En el otro extremo, se encuentran las 8 muestras de Castilla León donde no se detectó ninguna de estas especies. En el caso de Aragón apareció una situación peculiar donde todas las muestras procedentes de Huesca estaban contaminadas por *A. ochraceus* mientras que las recogidas en Teruel únicamente presentaban *A. steynii*.

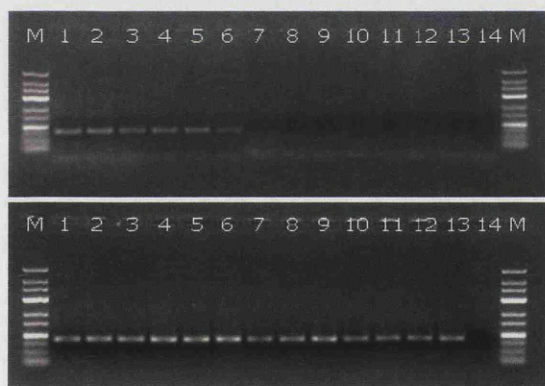
Comunidad Autónoma	Provincia	Muestra	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. steynii</i>
Castilla y León	Valladolid	1	-	-
		2	-	-
		3	-	-
		4	-	-
		5	-	-
	Palencia	6	-	-
	Burgos	7	-	-
		8	-	-
Castilla-La Mancha	Toledo	9	-	+
		10	-	+
		11	-	+
		12	+	+
	Ciudad Real	13	-	+
		14	+	+
		15	+	+
	Cuenca	16	-	-
	Guadalajara	17	+	-
		18	-	-
	Albacete	19	+	-
Aragón	Teruel	20	-	+
		21	-	+
		22	-	-
		23	-	+
	Huesca	24	+	-
		25	+	-
		26	+	-
Otras	Granada	27	-	-
		28	-	-
	Valencia	29	+	-
	Madrid	30	-	+

**Tabla 3.2.** Detección de *A. ochraceus* y *A. steynii* en las muestras según su origen geográfico. Un signo (+) implica detección de la especie en esa muestra y un signo (-) supone no presencia.

#### 4. ENSAYO DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *A. westerdijkiae* Y *A. ochraceus*

##### 4.1.- COMPROBACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES MEDIANTE PCR CONVENCIONAL

Los cebadores específicos para la detección y cuantificación de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* mediante PCR a tiempo real se diseñaron a partir de alineamientos de la región ITS1-5,8S-ITS2 de gran variedad de especies fúngicas. La secuencia de las parejas de cebadores diseñadas se muestra en el apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos. La especificidad de los cebadores OCRAQ1 y OCRAQ2 para la detección de las especies de estudio se comprobó mediante PCR convencional ensayando todos los aislamientos que aparecen en las tablas 3.1 y 3.6 de esta sección. Únicamente apareció una banda de unos 75 pb en el caso de que el DNA fuera de *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae* pero no en el caso de las otras especies probadas (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Amplificación por PCR convencional con los cebadores OCRAQ1/OCRAQ2 (arriba) y 5,8S1/5,8S2 (abajo). Carriles 1-3: *A. westerdijkiae* 3.38, 3.58, CECT 2948; carriles 4-6: *A. ochraceus* CECT 2969, H5, R1; carril 7: *A. niger* Gn14; carril 8: *A. tubingensis* Bo66; carril 9: *A. carbonarius* 325; carril 10: *A. flavus* 109, carril 11: *A. parasiticus* CECT 2680; carril 12: *P. nordicum* BFE 487; *F. verticillioides* FvMM1-2, carril 13: control negativo. M: Marcador de peso molecular GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.

Además se comprobó la universalidad de la pareja de cebadores diseñados, 5,8S1 y 5,8S2, para amplificar DNA de hongos que se pueden encontrar en los mismos sustratos que *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae*. Tanto en las especies de estudio como en el resto de las ensayadas aparecía una banda de aproximadamente 85 pb al visualizar los productos de PCR en un gel de agarosa (Figura 3.8).

##### 4.2.- OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE PCR A TIEMPO REAL

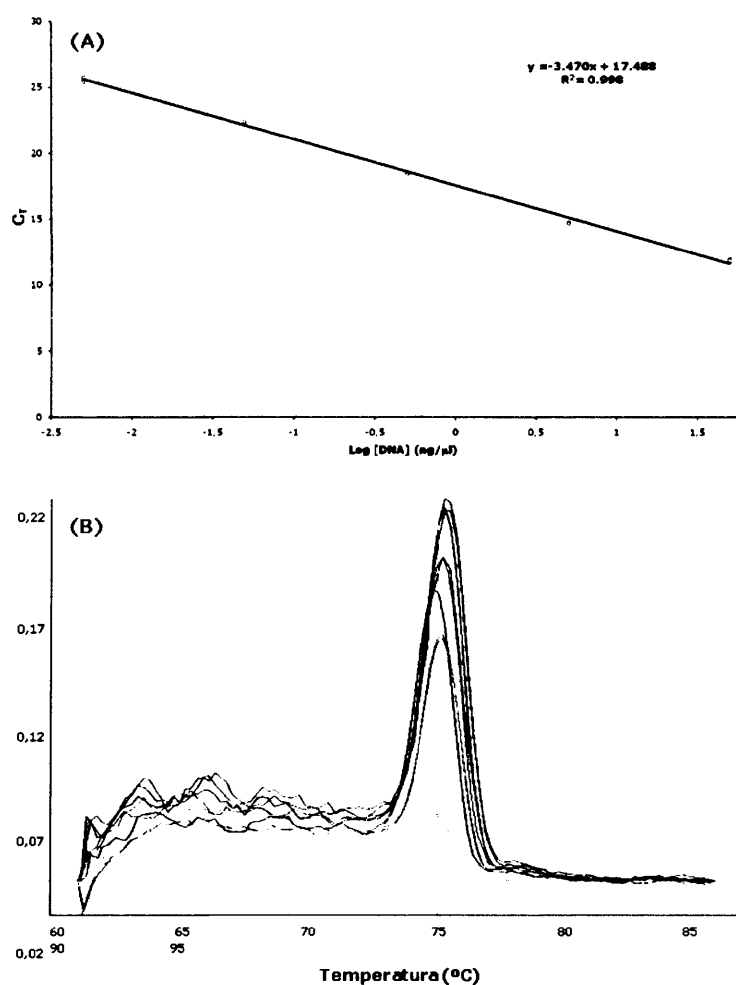
La curva estándar generada con la pareja de cebadores específicos OCRAQ1 y OCRAQ2 en las condiciones descritas en el apartado 3.2.5 de Materiales y Métodos se muestra en la figura 3.9.A. El valor del NTC (control negativo) fue de 31,27.

Se observó linealidad en todo el rango de datos analizado entre 50 y  $5 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ l. El alto dato del coeficiente de correlación obtenido ( $R^2=0,998$ ) indicó una fuerte correlación lineal entre el logaritmo decimal de la concentración de DNA

inicial y la  $C_T$ , lo que se traduce en que la variabilidad entre las réplicas era muy baja.

La pendiente de la curva estándar fue de -3,47, por lo que al realizar los cálculos apropiados según se explica en el apartado 3.2.5 de la sección Materiales y Métodos, se obtuvo una eficacia de amplificación del 94%.

La derivada negativa de la curva de disociación generada a partir de las diluciones de la curva estándar (figura 3.9.B) mostró un único pico en la gráfica, de manera que se dedujo que únicamente había amplificación de un fragmento específico con una temperatura de fusión de 79,4 °C y que no se formaban dímeros de cebadores.



**Figura 3.9.** Curva estándar (A) y derivada negativa de la curva de disociación (B) generadas para la puesta a punto del ensayo de PCR a tiempo real con los cebadores OCRAQ1/OCRAQ2.

#### 4.3.- VALORACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DNA

La eficacia del protocolo de extracción de DNA, *DNeasy Plant Mini Kit* fue evaluada en 5 extracciones independientes de dos cepas de *A. westerdijkiae* (CECT 2948 y ALF) y una de *A. ochraceus* (CECT 2093). Todas las extracciones de DNA se llevaron a cabo con éxito obteniendo valores de concentración de DNA entre 5 y 81 ng/μl al ser medidas en el espectrofotómetro Nanodrop®. Las muestras independientes de DNA se analizaron mediante el ensayo de PCR a tiempo real diseñado y los valores de  $C_T$  se interpolaron en la curva estándar obteniendo un rango de concentración entre 2 y 71 ng/μl.

Además, se realizaron diluciones decimales de cada una de estas extracciones que se evaluaron en los ensayos de PCR a tiempo real con los cebadores OCRAQ1 y OCRAQ2 para determinar la sensibilidad del método que se estableció en 2,5 pg/reacción.

#### 4.4.- COMPROBACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO DE PCR A TIEMPO REAL

Los resultados de los ensayos de PCR a tiempo real con las muestras que contenían distintas proporciones de DNA de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* con otras especies relacionadas o que contaminan los mismos sustratos, se muestran en las tablas 3.3 y 3.4, respectivamente.

No se obtuvo amplificación con la pareja de cebadores OCRAQ1/OCRAQ2 en las mezclas que no contenían DNA de *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae*, ya que los valores de  $C_T$  estaban muy próximos al NTC. Además, la concentración de DNA calculada al interpolar los valores de  $C_T$  en la curva estándar se relacionaba con la cantidad relativa de DNA inicial de esta especie en la muestra.

En todas las mezclas evaluadas se observó amplificación con la pareja de cebadores 5,8S1/5,8S2 independientemente de que hubiera presente DNA de las especies de estudio o no.



Mezcla	Especies	Proporción	C <sub>T</sub>	Concentración DNA (ng/μl)
1	<i>A. westerdijkiae</i>	100	21,33 ± 0,20	0,078
2	<i>A. westerdijkiae</i> <i>P. corylophilum</i>	50:50	22,75 ± 0,10	0,031
3	<i>A. westerdijkiae</i> <i>Fusarium sp.</i>	50:50	22,82 ± 0,04	0,029
4	<i>A. westerdijkiae</i> <i>A. flavus</i>	50:50	22,76 ± 0,09	0,030
5	<i>A. westerdijkiae</i> <i>A. flavus</i>	25:75	23,57 ± 0,21	0,018
6	<i>A. westerdijkiae</i> <i>A. tubingensis</i>	50:50	22,86 ± 0,01	0,028
7	<i>A. westerdijkiae</i> <i>A. tubingensis</i>	75:25	22,32 ± 0,13	0,041
8	<i>A. westerdijkiae</i> <i>A. carbonarius</i>	50:50	22,76 ± 0,06	0,030
9	<i>A. westerdijkiae</i> <i>A. carbonarius</i>	25:75	23,25 ± 0,08	0,022
10	<i>A. tubingensis</i>	100	30,61 ± 0,04	ND
11	<i>A. westerdijkiae</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. carbonarius</i>	33:33:33	23,50 ± 0,08	0,019
12	<i>P. corylophilum</i> <i>Fusarium sp.</i>	50:50	30,50 ± 0,28	ND

**Tabla 3.3.** Resultado del análisis por PCR a tiempo real con los cebadores OCRAQ1/OCRAQ2 de las mezclas que contenían DNA de *A. westerdijkiae*. Los valores de C<sub>T</sub> están expresados como la media de los duplicados ± la desviación estándar. La concentración de DNA se determinó interpolando los valores de C<sub>T</sub> en la curva estándar. ND=No detectado

Mezcla	Especies	Proporción	C <sub>T</sub>	Concentración DNA (ng/μl)
1	<i>A. ochraceus</i>	100	20,45 ± 0,02	0,140
2	<i>A. ochraceus</i> <i>P. corylophilum</i>	50:50	21,22 ± 0,00	0,084
3	<i>A. ochraceus</i> <i>Fusarium sp.</i>	50:50	21,57 ± 0,10	0,067
4	<i>A. ochraceus</i> <i>A. flavus</i>	50:50	21,65 ± 0,13	0,063
5	<i>A. ochraceus</i> <i>A. flavus</i>	25:75	22,92 ± 0,02	0,027
6	<i>A. ochraceus</i> <i>A. tubingensis</i>	50:50	21,42 ± 0,07	0,073
7	<i>A. ochraceus</i> <i>A. tubingensis</i>	75:25	21,15 ± 0,01	0,088

Mezcla	Especies	Proporción	C <sub>T</sub>	Concentración DNA (ng/μl)
8	<i>A. ochraceus</i> <i>A. carbonarius</i>	50:50	21,85 ± 0,00	0,055
9	<i>A. ochraceus</i> <i>A. carbonarius</i>	25:75	23,00 ± 0,03	0,026
10	<i>A. tubingensis</i>	100	34,34 ± 0,11	ND
11	<i>A. ochraceus</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. carbonarius</i>	33:33:33	22,47 ± 0,25	0,037
12	<i>P. corylophilum</i> <i>Fusarium sp.</i>	50:50	32,94 ± 0,14	ND

**Tabla 3.4.** Resultado del análisis por PCR a tiempo real con los cebadores OCRAQ1/OCRAQ2 de las mezclas que contenían DNA de *A. ochraceus*. Los valores de C<sub>T</sub> están expresados como la media de los duplicados ± la desviación estándar. La concentración de DNA se determinó interpolando los valores de C<sub>T</sub> en la curva estándar. ND=No detectado.

#### 4.5.- EFECTO DE LA PRESENCIA DEL DNA DEL HOSPEDADOR

Se evaluó la posible inhibición del ensayo por la presencia de DNA exógeno procedente de dos hospedadores donde se ha encontrado frecuentemente a *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae*: uvas y café verde. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 3.5. Los valores de C<sub>T</sub> obtenidos en las reacciones de PCR a tiempo real de las muestras que contenían DNA de *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae* y DNA tanto de uvas como de café verde no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) cuando se comparan con los ensayos control (DNA del hongo diluido en tampón de elución).

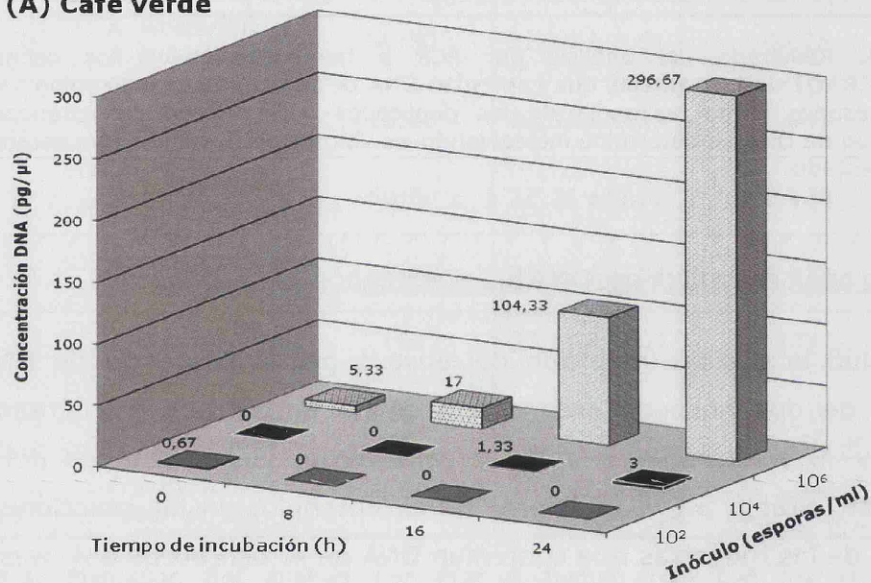
			C <sub>T</sub>		
			DNA hongo	DNA hongo + DNA café verde	DNA hongo + DNA uvas
Cepa	<i>A. ochraceus</i>	CECT 2093	13,13 ± 0,36	13,09 ± 0,48	13,77 ± 1,12
		CECT 2948	16,39 ± 2,38	16,29 ± 2,21	17,87 ± 2,50
	<i>A. westerdijkiae</i>	ALF	15,11 ± 1,21	15,14 ± 1,84	15,59 ± 2,23

**Tabla 3.5.** Evaluación del efecto de la presencia del DNA del hospedador sobre la reacción de PCR a tiempo real. Se muestran la media de los valores de C<sub>T</sub> de las cinco extracciones independientes en las tres condiciones mencionadas en el texto (media ± desviación estándar). No se aprecian diferencias significativas cuando el DNA del hongo es analizado solo o con DNA de café o uvas ( $p>0,05$ ).

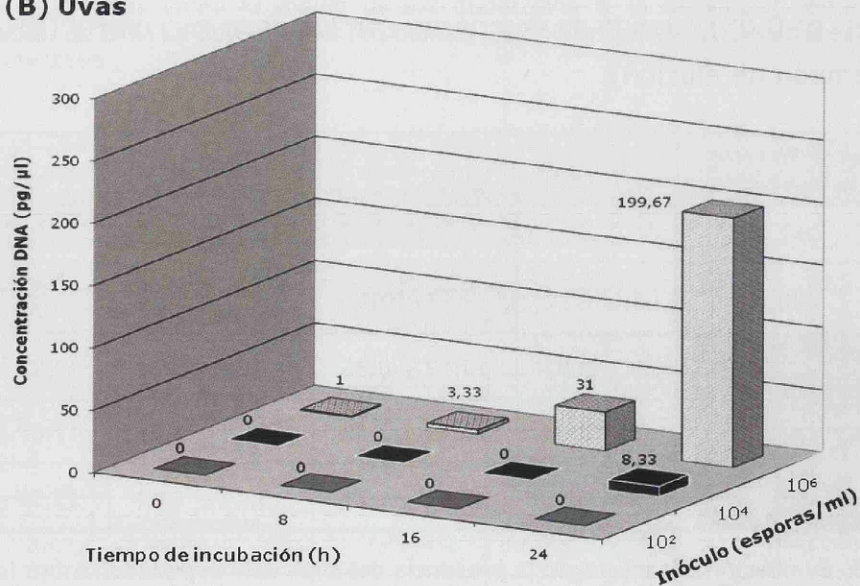
#### 4.6.- DETECCIÓN DE *A. westerdijkiae* Y *A. ochraceus* EN MUESTRAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS

Los resultados de la detección de *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* en muestras artificialmente contaminadas tras distintos tiempos de incubación se muestran en la figura 3.10. Cuando los granos de café verde (Figura 3.10.A) o las uvas (Figura 3.10.B) se inocularon con una alta concentración de esporas ( $10^6$  esporas/ml), el hongo se podía detectar mediante el ensayo de PCR a tiempo real incluso sin

**(A) Café verde**



**(B) Uvas**



**Figura 3.10.** Detección mediante PCR a tiempo real de DNA fúngico en café verde (A) o uvas (B) artificialmente contaminados. Los datos corresponden a la media de dos cepas de *A. westerdijkiae* y una de *A. ochraceus* en cada una de las condiciones indicadas.

incubación. Además según avanzaba el tiempo desde la inoculación, la detección de la especie se incrementaba. De los datos se pudo deducir que el ensayo de detección del hongo en granos de café verde es más sensible que en uvas.

Valores intermedios de concentración de esporas ( $10^4$  esporas/ml) únicamente revelaron la aparición de *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae* después de 16 horas de incubación en café verde y 24 horas en uvas. Además, en café la concentración de DNA detectada aumentó con el tiempo de incubación.

Ninguna de las especies se detectó utilizando el ensayo diseñado en muestras inoculadas con una suspensión de  $10^2$  esporas/ml ni siquiera cuando se incubó durante 24 horas.

Los controles de uvas y granos de café verde inoculados con suero salino, en ningún caso, generaron una señal detectable en el ensayo de PCR a tiempo real con la pareja de cebadores OCRAQ1/OCRAQ2, ya que se obtuvieron valores muy cercanos al NTC.

## **5. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI**

Los protocolos de cultivo así como de extracción y cuantificación de OTA en el medio utilizado se detallan en el apartado 4 de la sección Materiales y Métodos.

Los valores de OTA detectados en las placas de medio CYA donde se inocularon distintas especies de *Aspergillus* sección Circumdati tras 7 días de incubación se muestran en la tabla 3.6. Los niveles más altos de producción se encontraron en las cepas de *A. steynii* con un valor medio de 41,1  $\mu\text{g/g}$ , seguidas de los aislamientos de *A. westerdijkiae* con una media de 2,5  $\mu\text{g/g}$ . Hay que destacar la capacidad productora de la cepa 3.53 de *A. steynii* que alcanzó los valores más altos de concentración de toxina en el medio (221,6  $\mu\text{g/g}$ ). *A. elegans* y *A. ochraceus* también son capaces de producir OTA pero a unos niveles mucho más bajos (0,07 y 0,007  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente).

*A. steynii* presentó el mayor porcentaje de cepas productoras de OTA (90%). Aunque los niveles de producción fueron mucho más bajos, *A. elegans* también destacó en este aspecto ya que el 83% de las cepas fueron capaces de producir OTA. Un porcentaje importante de los aislamientos de *A. westerdijkiae* (66,7%) produjo la toxina, mientras que en el caso de *A. ochraceus* la proporción fue sólo de un 22,2%.

Especie	Cepa	Origen	OTA (µg/g)
<i>A. elegans</i>	CBS 102.14	Desconocido	$7,5 \times 10^{-3}$
	CBS 310.80	Desconocido	$3,1 \times 10^{-1}$
	CBS 614.78	Desconocido	$8,0 \times 10^{-3}$
	CBS 615.78	Desconocido	ND
	IMI 345568	Desconocido	$1,0 \times 10^{-1}$
	IMI 345571	Desconocido	$9,0 \times 10^{-3}$
<i>A. ochraceus</i>	H5A	Harina de cebada	ND
	H21O	Harina de cebada	$7,5 \times 10^{-4}$
	PD8-1 <sup>a</sup>	Pimentón dulce	ND
	PDF2 <sup>a</sup>	Pimentón dulce ahumado	ND
	PDF2-1 <sup>a</sup>	Pimentón dulce ahumado	$6,1 \times 10^{-2}$
	PDF3 <sup>a</sup>	Pimentón dulce ahumado	ND
	PP2-5 <sup>a</sup>	Pimentón picante	ND
	PP8 <sup>a</sup>	Pimentón picante	ND
	R1 <sup>a</sup>	Romero	ND
<i>A. steynii</i>	3.53 <sup>a</sup>	Café verde	221,6
	Aso2 <sup>b</sup>	Uvas	112,9
	CBS 112812	Café	13,8
	CBS 112813	Desconocido	ND
	CBS 112814	Café	20,8
	CBS 121991	Café	3,6
	CBS 121993	Café	32,4
	H2A	Harina de cebada	1,2
	H7A	Harina de cebada	1,7
	H21S	Harina de cebada	2,9
<i>A. westerdijkiae</i>	10.5.1	Anís	$8,0 \times 10^{-2}$
	3.38 <sup>a</sup>	Ambiente	ND
	3.58 <sup>a</sup>	Uvas	$9,0 \times 10^{-1}$
	3.66 <sup>a</sup>	Uvas	$8,8 \times 10^{-2}$
	CCT 6795	Café	1,8
	CECT 2948	Sorgo	5,9
	D5 <sup>a</sup>	Pastel	$7,3 \times 10^{-1}$
	PCH1 <sup>a</sup>	Pistacho	ND
	PA 22.1.1	Anís	ND
	PA 22.2.1	Anís	ND
	PA 22.3.2	Anís	ND
	PA 22.6.2	Anís	$7,2 \times 10^{-2}$
	PA 22.6.5	Anís	ND
	AOPD 16-1	Pimentón dulce	26,6
	AOPD 16-2	Pimentón dulce	1,4
	AOPD 16-3	Pimentón dulce	$3,2 \times 10^{-1}$
	AOPD 16-4	Pimentón dulce	7,0
	PDF1 <sup>a</sup>	Pimentón dulce ahumado	$1,0 \times 10^{-1}$

**Tabla 3.6.** Concentración de OTA detectada en medio CYA donde se inocularon los distintos aislamientos. Los resultados son las medias de dos repeticiones de cada cepa mencionada en las mismas condiciones. Los resultados se muestran en µg de OTA por g de agar.

## 6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA ACTIVIDAD DE AGUA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN *A. westerdijkiae* Y *A. steynii*

### 6.1.- EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA ACTIVIDAD DE AGUA SOBRE EL CRECIMIENTO

Tras la siembra e incubación de las dos cepas de *A. steynii* y *A. westerdijkiae* tal y como se detalla en el apartado 5.1 de la sección Materiales y Métodos, se midió el diámetro de la colonia y este dato se utilizó como un indicador del crecimiento fúngico. Los resultados de las medidas del diámetro de las colonias de *A. steynii* y *A. westerdijkiae* en todas las condiciones probadas en medio CYA, se representan en la figura 3.11 y los datos obtenidos en los análisis estadísticos se muestran en la tabla 3.7.

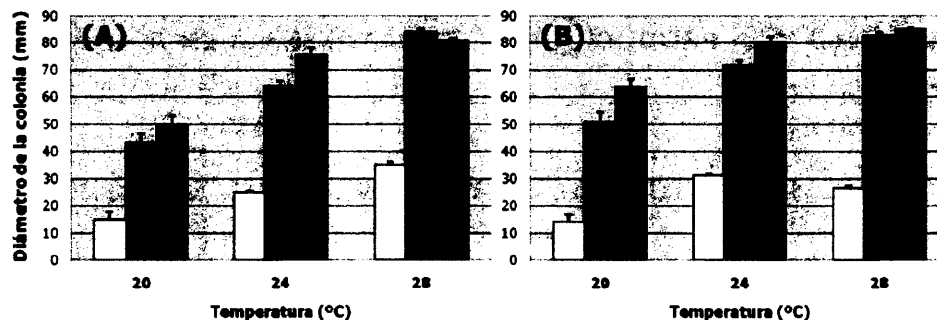
<i>A. steynii</i>				<i>A. westerdijkiae</i>			
Variable	GL	KW	P	Variable	GL	KW	P
Temperatura	2	4,678	0,096	Temperatura	2	3,934	0,140
$a_w$	2	11,415	0,003	$a_w$	2	11,954	0,003

**Tabla 3.7.** Resultados del análisis estadístico para el crecimiento en medio CYA de *A. steynii* y *A. westerdijkiae* para las dos variables estudiadas. GL: Grados de libertad, KW: Valor del estadístico Kruskal-Wallis, P: p-valor.

En la figura 3.11 se puede comprobar que el crecimiento en *A. steynii* y *A. westerdijkiae* fue muy similar en este medio en todas las condiciones probadas y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diámetros de las colonias tras 10 días de incubación en las dos especies. Por otro lado, el estudio realizado indicó que no había diferencias significativas entre los valores obtenidos de las dos cepas de cada una de las especies ( $p > 0,05$ ), por lo que los resultados se representan como la media de los datos recogidos de los duplicados de las dos cepas de cada una de las especies.

La temperatura no afectó de manera significativa al crecimiento ni en *A. westerdijkiae* ni en *A. steynii*. Sin embargo, en ambos casos, se apreciaba una tendencia al incremento del crecimiento según aumentaba la temperatura.

La  $a_w$  influye en el crecimiento de ambas especies. El diámetro de la colonia se redujo de manera significativa a la  $a_w$  más baja, mientras que no se encontraron diferencias cuando la  $a_w$  era 0,964 y 0,995 tanto en *A. westerdijkiae* como en *A. steynii*.



**Figura 3.11.** Evaluación del crecimiento de *A. steynii* (A) y *A. westerdijkiae* (B) en medio CYA a las diferentes temperaturas y  $a_w$  (barras blancas= $a_w$  0,928, grises=  $a_w$  0,964 y negras=  $a_w$  0,995). Se representa la media de las dos réplicas de las dos cepas analizadas para cada especie. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de los datos.

## 6.2.- EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA ACTIVIDAD DE AGUA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A

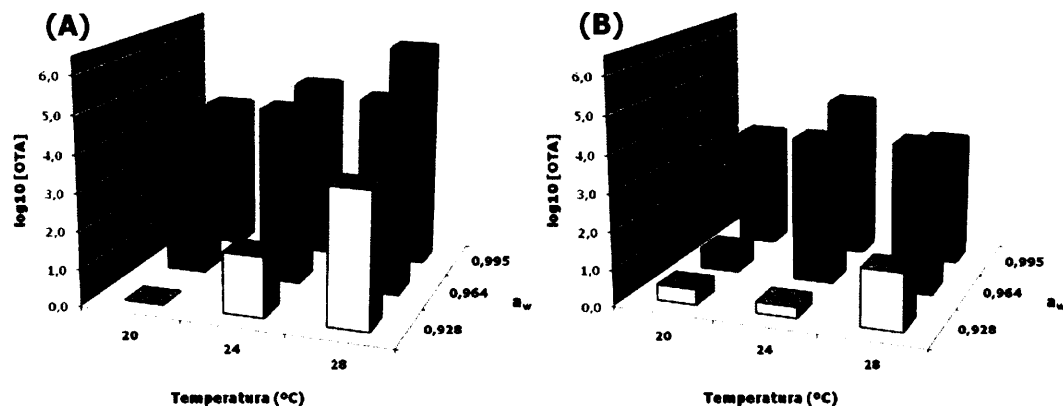
Los valores de concentración de OTA producida por *A. steynii* y *A. westerdijkiae* en medio CYA en todas las condiciones de  $a_w$  y temperatura estudiadas se reflejan en las la tablas 3.8 y 3.9. Además estos datos se representan gráficamente en la figura 3.12.

		<i>A. steynii</i>		
		20 °C	24 °C	28 °C
CYA	0,928	ND	0,0858±0,0858	0,5737±0,4123
	0,964	0,9131±0,5836	6,9298±4,7238	15,6993±7,2210
	0,995	1,3086±0,0789	9,9260±6,5105	128,6610±36,2978

**Tabla 3.8.** Valores de concentración de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) producida por *A. steynii* en medio CYA en todas las condiciones de temperatura y  $a_w$  ensayadas. Los datos se muestran como la media de las 4 determinaciones realizadas (2 réplicas de cada cepa)  $\pm$  desviación estándar.

		<i>A. westerdijkiae</i>		
		20 °C	24 °C	28 °C
CYA	0,928	0,0004±0,0004	0,0002±0,0002	0,0589±0,0589
	0,964	0,0007±0,0007	1,3242±1,0558	1,5890±1,2458
	0,995	0,2527±0,1837	2,3616±0,3157	0,3324±0,1457

**Tabla 3.9.** Valores de concentración de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) producida por *A. westerdijkiae* en medio CYA en todas las condiciones de temperatura y  $a_w$  ensayadas. Los datos se muestran como la media de las 4 determinaciones realizadas de cada especie (2 réplicas de cada cepa)  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 3.12.** Niveles de producción de OTA por *A. steynii* (A) y *A. westerdijkiae* (B) en medio CYA a las diferentes temperaturas y  $a_w$ . Para facilitar la interpretación de las gráficas, se representa el  $\log_{10}$  de la concentración de OTA detectada en el medio en ng/g. Las barras corresponden a la media de las dos réplicas de las dos cepas analizadas para cada especie tras 10 días de incubación.

Como se puede apreciar en la figura 3.12, los perfiles de producción de OTA de ambas especies no fueron demasiado similares. Además los niveles de producción de *A. steynii* fueron significativamente superiores a los de *A. westerdijkiae* en todas las condiciones probadas. El estudio realizado indicó que no había diferencias significativas entre las dos cepas de cada una de las especies ( $p > 0,05$ ), por lo que los resultados se representan como la media de los datos recogidos de los duplicados de las dos cepas de *A. westerdijkiae* y *A. steynii*.

Los resultados de los análisis estadísticos efectuados para comprobar el efecto de la temperatura y la  $a_w$  sobre la producción de OTA en las especies de estudio se muestran en la tabla 3.10.

<i>A. steynii</i>				<i>A. westerdijkiae</i>			
Variable	GL	KW	P	Variable	GL	KW	P
Temperatura	2	4,275	0,118	Temperatura	2	2,875	0,238
$a_w$	2	11,028	0,004	$a_w$	2	8,039	0,018

**Tabla 3.10.** Resultados del análisis estadístico para la producción de OTA en medio CYA de *A. steynii* y *A. westerdijkiae* para las dos variables estudiadas. GL: Grados de libertad, KW: Valor del estadístico Kruskal-Wallis, P: p-valor.

Como ocurría en el caso del análisis del crecimiento fúngico, la temperatura no afectó de manera estadísticamente significativa a la producción de OTA en ninguna de las dos especies. Sin embargo, en *A. steynii* se apreció una clara tendencia al incremento de la producción de OTA cuando aumentaba la temperatura. En *A.*



*westerdijkiae* no se pudo ver esta tendencia ya que el efecto de la temperatura sobre la capacidad de producción de OTA varía mucho según sea la  $a_w$ .

La  $a_w$  influyó en la producción de OTA en *A. steynii* de igual forma que sobre el crecimiento. La concentración de OTA en el medio se redujo de manera significativa a la  $a_w$  más baja, mientras que no se encontraron diferencias cuando la  $a_w$  era 0,964 y 0,995. Sin embargo, el efecto sobre *A. westerdijkiae* fue diferente al encontrar únicamente diferencias entre las dos condiciones extremas de  $a_w$  ensayadas.

## 7. EFECTO DEL SUSTRATO SOBRE EL CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y LA ESPORULACIÓN DE *A. westerdijkiae* Y *A. steynii* EN DISTINTAS CONDICIONES DE TEMPERATURA Y ACTIVIDAD DE AGUA

### 7.1.- EFECTO DEL SUSTRATO, LA ACTIVIDAD DE AGUA Y LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO

Los resultados del crecimiento de las colonias de las especies de estudio en todas las condiciones y medios probados se representan en la figura 3.13 y los datos obtenidos en los análisis estadísticos se muestran en la tabla 3.11.

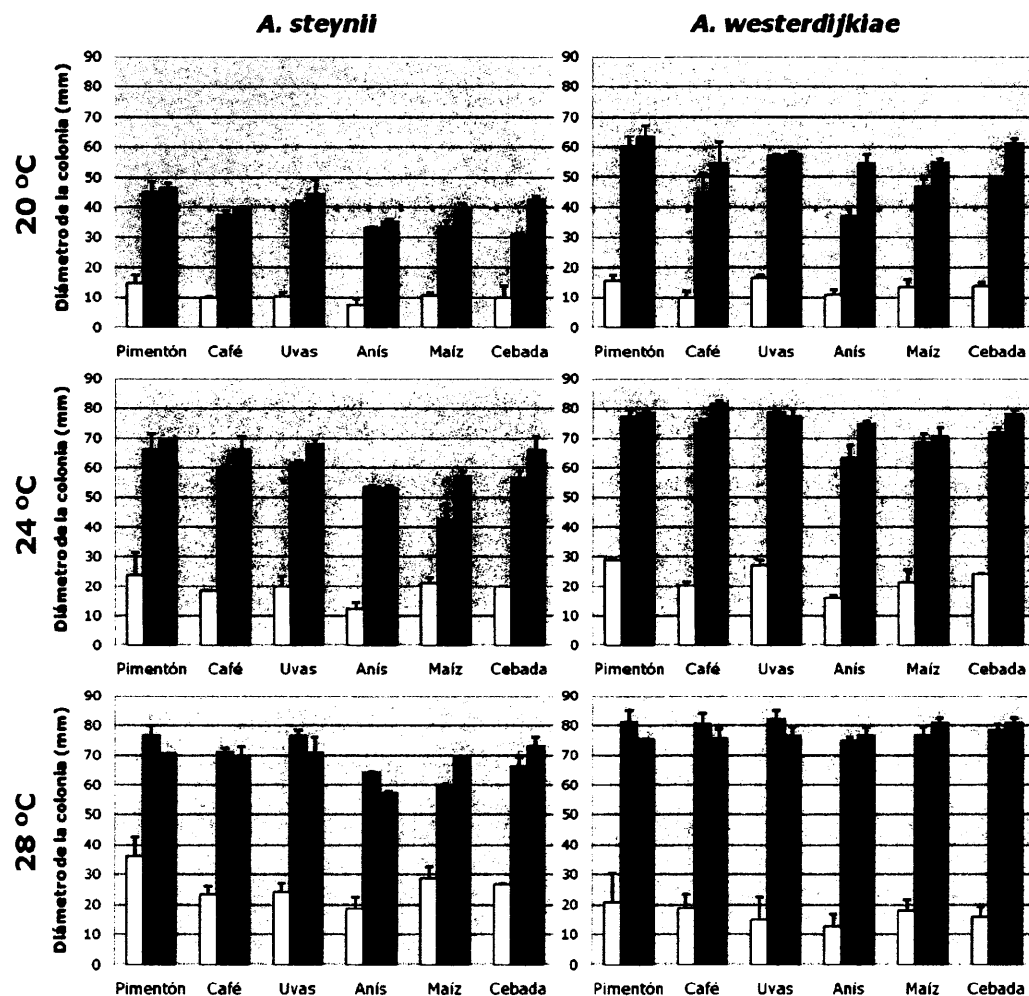
<i>A. steynii</i>				<i>A. westerdijkiae</i>			
Variable	GL	KW	P	Variable	GL	KW	P
Medio	5	4,890	0,429	Medio	5	2,412	0,790
Temperatura	2	25,150	<0,001	Temperatura	2	18,283	<0,001
$a_w$	2	69,156	<0,001	$a_w$	2	71,811	<0,001

**Tabla 3.11.** Resultados del análisis estadístico para el crecimiento en *A. steynii* y *A. westerdijkiae* para todas las variables estudiadas. GL: Grados de libertad, KW: Valor del estadístico Kruskal-Wallis, P: p-valor.

Los perfiles de crecimiento en ambas especies fueron bastante similares en todas las condiciones probadas (Figura 3.13). Sin embargo, el análisis muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre ambas especies, siendo superior el crecimiento tras 10 días de incubación en el caso de *A. westerdijkiae*. El estudio realizado indicó que no había diferencias significativas entre las dos cepas de cada una de las especies ( $p > 0,05$ ), por lo que los resultados se representan como la media de los datos recogidos de los duplicados de las dos cepas de *A. westerdijkiae* y *A. steynii*.

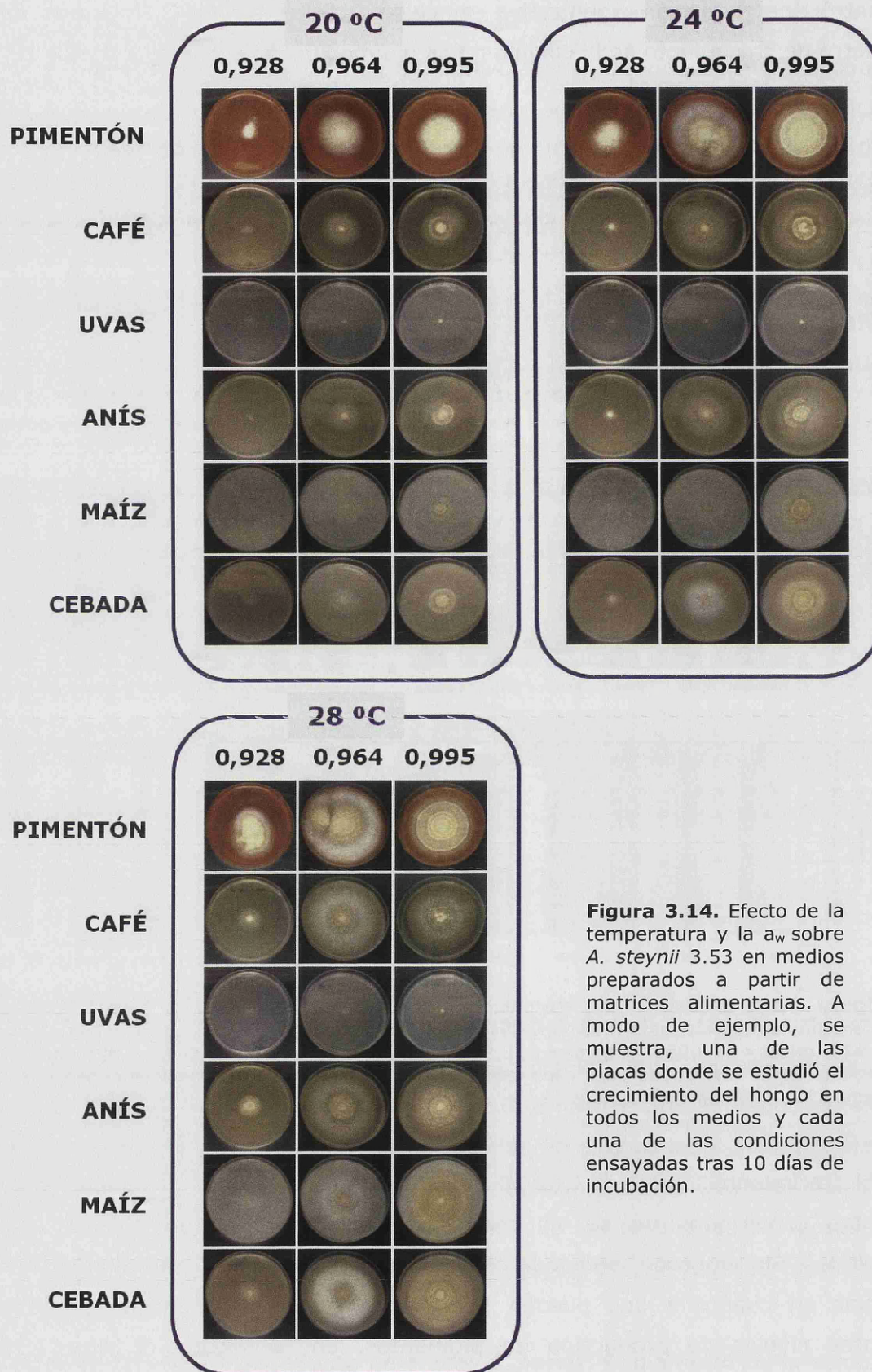
La  $a_w$  influyó en el crecimiento de ambas especies. El diámetro de la colonia se redujo de manera significativa a la  $a_w$  más baja, mientras que no se encontraron diferencias cuando la  $a_w$  era 0,964 y 0,995 tanto en *A. westerdijkiae* como en *A.*

*steynii*. La temperatura afectó de igual manera a ambas especies ya que se encontró una reducción significativa en el crecimiento a 20 °C, mientras que el diámetro de crecimiento de la colonia no se vio modificado entre los 24 y los 28 °C.



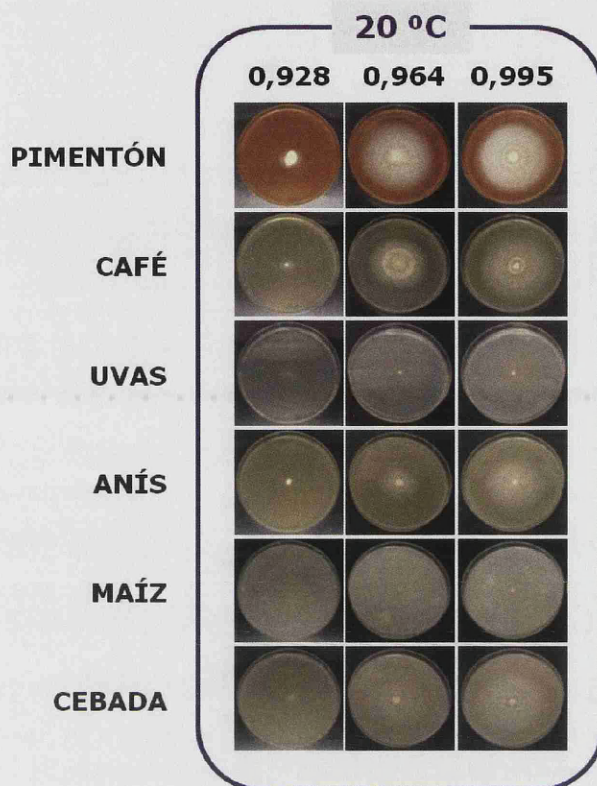
**Figura 3.13.** Evaluación del crecimiento de *A. steynii* (izquierda) y *A. westerdijkiae* (derecha) en los distintos medios, a las diferentes temperaturas y  $a_w$  (barras blancas= $a_w$  0,928, grises= $a_w$  0,964 y negras= $a_w$  0,995). Se representa la media de las dos réplicas de las dos cepas analizadas para cada especie. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de los datos.

El crecimiento alcanzado tras 10 días de incubación en las dos especies en las distintas condiciones no se vio modificado por el medio en el que estaban inoculadas. Sin embargo, se puede comprobar una apariencia muy diferente de las colonias en cuanto a que pueden ser más o menos algodonosas o presentar distintos niveles de producción de pigmentos. En las figuras 3.14 y 3.15 se muestran ejemplos de placas en cada una de las condiciones y medios probados de *A. steynii* 3.53 y *A. westerdijkiae* CECT 2948.

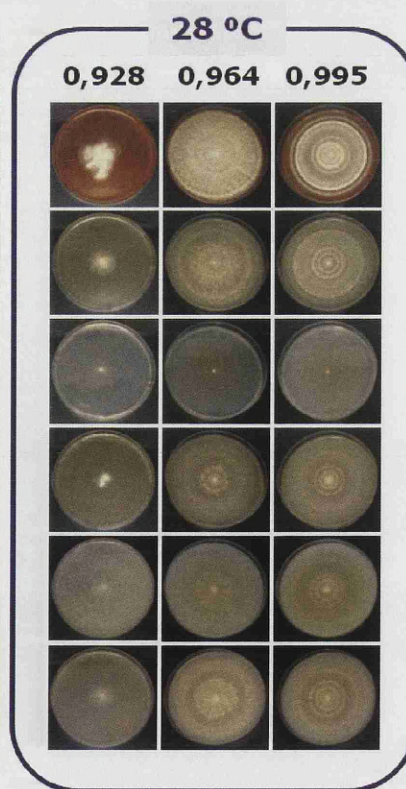
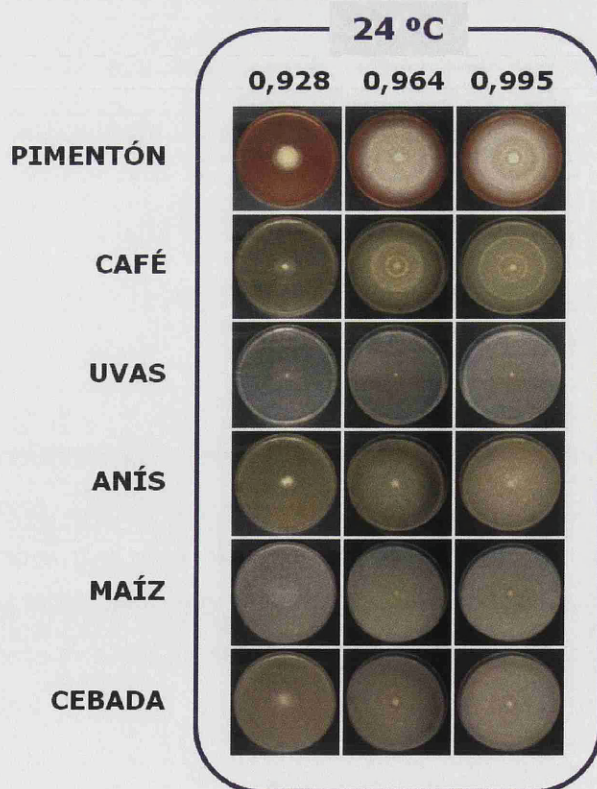


**Figura 3.14.** Efecto de la temperatura y la  $a_w$  sobre *A. steynii* 3.53 en medios preparados a partir de matrices alimentarias. A modo de ejemplo, se muestra, una de las placas donde se estudió el crecimiento del hongo en todos los medios y cada una de las condiciones ensayadas tras 10 días de incubación.





**Figura 3.15.** Efecto de la temperatura y la  $a_w$  sobre *A. westerdijkiae* CECT 2948 en los distintos medios preparados a partir de matrices alimentarias. Se muestra, a modo de ejemplo, una de las placas donde se estudió el crecimiento del hongo en todos los medios y cada una de las condiciones ensayadas tras 10 días de incubación.



## 7.2.- EFECTO DEL SUSTRATO, LA ACTIVIDAD DE AGUA Y LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A

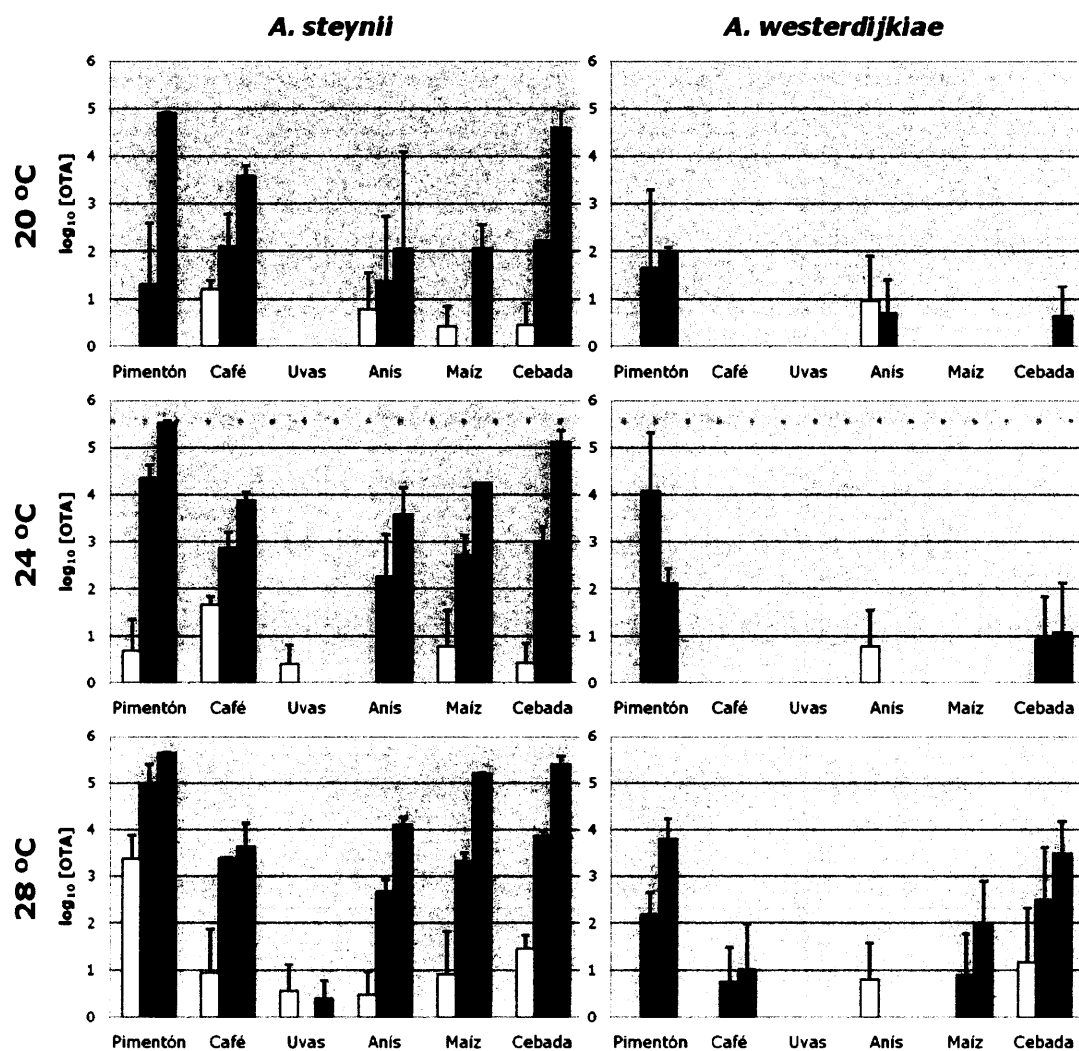
Los resultados de producción de OTA de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* en todas las condiciones y medios probados se representan en la figura 3.16 y las tablas 3.13 y 3.14, mientras que los datos obtenidos en los análisis estadísticos para cada una de las especies por separado se muestran en la tabla 3.12.

En la figura 3.16 se puede observar la gran diferencia que se obtuvo entre los perfiles de producción de OTA de ambas especies, ya que *A. steynii* fue capaz de producir OTA en un rango de condiciones más amplias y a niveles más altos que *A. westerdijkiae*. El análisis estadístico apoyó esta afirmación ya que aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre la producción de ambas especies e indicó que los niveles de OTA detectados son mayores en el caso de *A. steynii*. El estudio realizado indicó que no había diferencias significativas entre las dos cepas de cada una de las especies ( $p > 0,05$ ), por lo que los resultados se representan como la media de los datos obtenidos en los duplicados de las dos cepas de *A. westerdijkiae* y *A. steynii*.

<i>A. steynii</i>				<i>A. westerdijkiae</i>			
Variable	GL	KW	P	Variable	GL	KW	P
Medio	5	32,738	<0,001	Medio	5	27,337	<0,001
Temperatura	2	8,420	0,015	Temperatura	2	7,277	0,026
a <sub>w</sub>	2	34,263	<0,001	a <sub>w</sub>	2	7,022	0,030

**Tabla 3.12.** Resultados del análisis estadístico para la producción de OTA en *A. steynii* y *A. westerdijkiae* para todas las variables estudiadas. GL: Grados de libertad, KW: Valor del estadístico Kruskal-Wallis, P: p-valor.

Todos los factores analizados influyeron significativamente en la producción de OTA en ambas especies. La capacidad para producir la toxina de *A. steynii* fue similar en todos los medios excepto en el de uvas en el que la concentración de la toxina en el medio fue significativamente menor. Hay que destacar que sólo *A. steynii* fue capaz de producir OTA en este medio aunque los niveles fueron muy bajos. En el caso de *A. westerdijkiae*, la producción fue similar en todos los casos aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los medios de uva y pimentón, ya que en este último los niveles de producción fueron muy elevados. Hay que destacar que esta última especie cuando creció en medios de café y maíz, solamente fue capaz de producir OTA en el caso de que la temperatura fuera 28 °C y a los dos niveles de a<sub>w</sub> más altos de los analizados.



**Figura 3.16.** Evaluación de la producción de OTA por *A. steynii* (izquierda) y *A. westerdijkiae* (derecha) en los distintos medios, a las diferentes temperaturas y  $a_w$  (barras blancas= $a_w$  0,928, grises=  $a_w$  0,964 y negras=  $a_w$  0,995). Para facilitar la interpretación de las gráficas, se representa el  $\log_{10}$  de la concentración de OTA detectada en el medio en ng/g. Las barras corresponden a la media de las dos réplicas de las dos cepas analizadas para cada especie. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

La modificación en la  $a_w$  supuso mayor efecto en las cepas de *A. steynii* que en *A. westerdijkiae*. En el primer caso, se detectaron diferencias significativas entre todos los niveles probados y se confirmó que la producción de OTA aumentaba con la  $a_w$ . Sin embargo, en la segunda especie hubo diferencias significativas en la producción de OTA únicamente al nivel más bajo de  $a_w$  (0,928).

La producción de OTA por *A. steynii* en los medios basados en las matrices alimentarias también se vio influenciada por la temperatura, reduciéndose significativamente a 20 °C. Además, de manera general, la producción de OTA en esta especie tendió a incrementarse con la temperatura. En el caso de *A. westerdijkiae*, la temperatura no supuso una variación en la producción de OTA.

El medio preparado a partir de pimentón fue en el que se alcanzaron los máximos niveles de producción para ambas especies aunque las condiciones óptimas fueron diferentes para cada una de ellas: 28 °C y  $a_w=0,995$  para *A. steynii* ([OTA]=43,32 µg/g) y 24 °C y  $a_w=0,964$  para *A. westerdijkiae* ([OTA]=10,28 µg/g).

		<i>A. steynii</i>		
		20 °C	24 °C	28 °C
Pimentón	0,928	ND	0,0012±0,0012	0,4117±0,3377
	0,964	0,0200±0,0200	2,6946±1,4879	14,0926±10,7641
	0,995	8,2941±0,2714	33,8266±3,5281	43,3155±2,3825
Café	0,928	0,0017±0,0007	0,0049±0,0019	0,0038±0,0038
	0,964	0,0323±0,0297	0,0977±0,0643	0,2397±0,0100
	0,995	0,4326±0,2056	0,8168±0,3243	0,7614±0,6267
Uvas	0,928	ND	0,0003±0,0003	0,0007±0,0007
	0,964	ND	ND	ND
	0,995	ND	ND	0,0003±0,0003
Anís	0,928	0,0018±0,0018	ND	0,0005±0,0005
	0,964	0,0279±0,0279	0,0732±0,0709	0,0557±0,0302
	0,995	0,6104±0,6104	0,7642±0,6667	1,3626±0,4964
Maíz	0,928	0,0004±0,0004	0,0018±0,0018	0,0033±0,0033
	0,964	ND	0,0802±0,0597	0,2232±0,0850
	0,995	0,0199±0,0163	1,7600±0,0240	16,1440±0,1755
Cebada	0,928	0,0004±0,0004	0,0004±0,0004	0,0035±0,0020
	0,964	0,0160±0,0007	0,1291±0,0789	0,7498±0,1538
	0,995	5,5628±3,9820	15,5655±7,7880	27,1579±9,9262

**Tabla 3.13.** Valores de concentración de OTA (µg/g) producida por *A. steynii* en cada uno de los medios preparados a partir de matrices alimentarias en todas las condiciones de temperatura y  $a_w$  ensayadas. Los datos se muestran como la media de las 4 medidas por HPLC de cada especie (2 réplicas de cada cepa) ± desviación estándar.

		<b>A. westerdijkiae</b>		
		<b>20 °C</b>	<b>24 °C</b>	<b>28 °C</b>
<b>Pimentón</b>	0,928	ND	ND	ND
	0,964	0,0983±0,0983	10,2810±10,2118	0,0251±0,0199
	0,995	0,0101±0,0018	0,0168±0,0106	0,9784±0,7426
<b>Café</b>	0,928	ND	ND	ND
	0,964	ND	ND	0,0015±0,0015
	0,995	ND	ND	0,0049±0,0049
<b>Uvas</b>	0,928	ND	ND	ND
	0,964	ND	ND	ND
	0,995	ND	ND	ND
<b>Anís</b>	0,928	0,0040±0,0040	0,0018±0,0018	0,0019±0,0019
	0,964	0,0013±0,0013	ND	ND
	0,995	ND	ND	ND
<b>Maíz</b>	0,928	ND	ND	ND
	0,964	ND	ND	0,0030±0,0030
	0,995	ND	ND	0,0398±0,0387
<b>Cebada</b>	0,928	ND	ND	0,0104±0,0104
	0,964	ND	0,0035±0,0035	0,2144±0,2121
	0,995	0,0009±0,0009	0,0067±0,0067	0,7860±0,7245

**Tabla 3.14.** Valores de concentración de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) producida por *A. westerdijkiae* en cada uno de los medios preparados a partir de matrices alimentarias en todas las condiciones de temperatura y  $a_w$  ensayadas. Los datos se muestran como la media de las 4 medidas por HPLC de cada especie (2 réplicas de cada cepa)  $\pm$  desviación estándar.

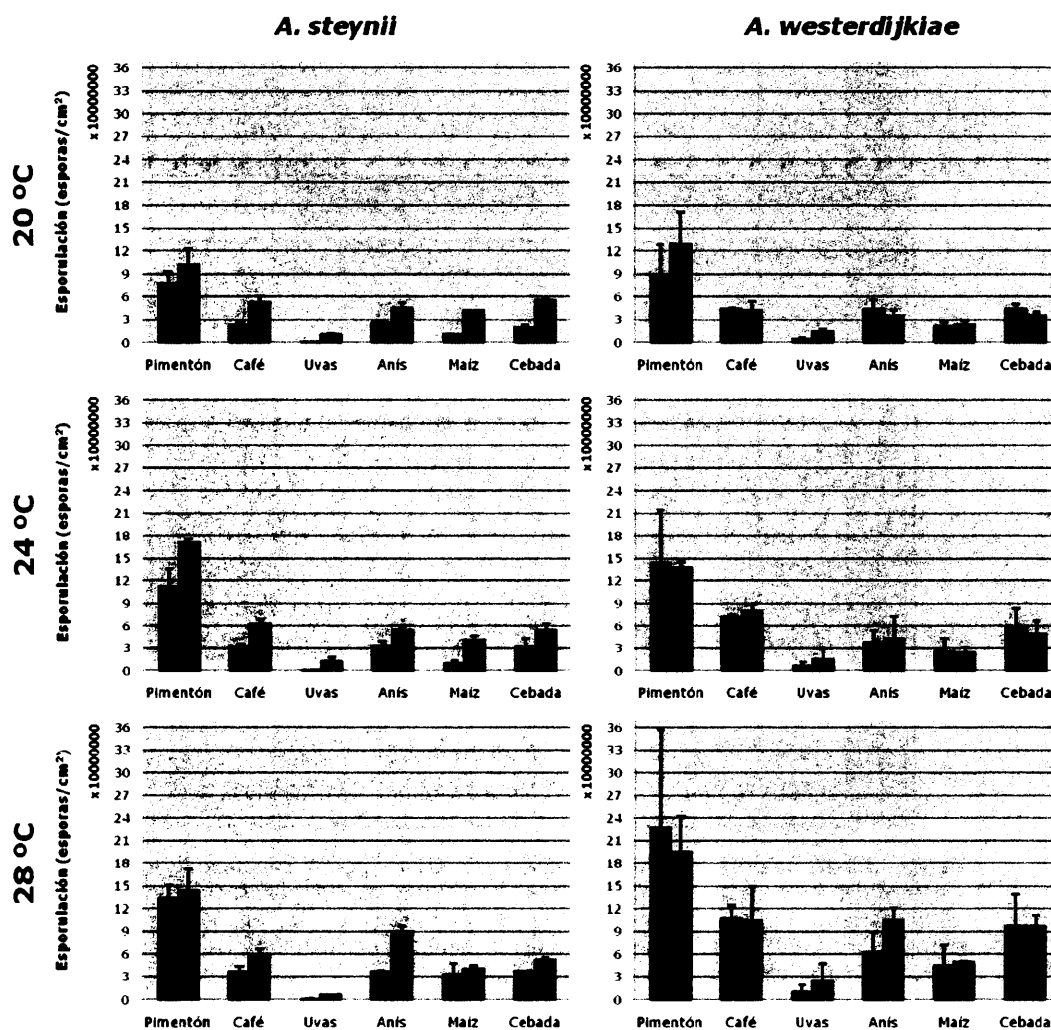
### 7.3.- EFECTO DEL SUSTRATO, LA ACTIVIDAD DE AGUA Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ESPORULACIÓN

Uno de los aspectos que se suele ver modificado por los factores abióticos es la tasa de esporulación, por lo que se analizó la cantidad de esporas producidas por ambos hongos en cada una de las condiciones. Los resultados de la esporulación de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* en todas las condiciones y medios probados se representan en la figura 3.17.

Los resultados del estudio estadístico para las distintas variables se muestran en la tabla 3.15. El análisis de los datos reveló que no había diferencias en la esporulación de las dos especies estudiadas aunque en la mayoría de los casos *A. westerdijkiae* produjo mayor número de esporas que *A. steynii*. El estudio realizado indicó que no hay diferencias significativas entre las dos cepas de cada una de las



especies, por lo que los resultados se representan como la media de los datos recogidos de los duplicados de las dos cepas de *A. westerdijkiae* y *A. steynii*.



**Figura 3.17.** Evaluación de la esporulación de *A. steynii* (izquierda) y *A. westerdijkiae* (derecha) en los distintos medios, a las diferentes temperaturas y  $a_w$  (barras grises=  $a_w$  0,964 y negras=  $a_w$  0,995). Las barras corresponden a la media de las dos réplicas de las dos cepas analizadas para cada especie. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

<i>A. steynii</i>				<i>A. westerdijkiae</i>			
Variable	GL	KW	P	Variable	GL	KW	P
Medio	5	50,451	<0,001	Medio	5	49,48	<0,001
Temperatura	2	1,125	0,570	Temperatura	2	6,107	0,047

**Tabla 3.15.** Resultados del análisis estadístico para la esporulación en *A. steynii* y *A. westerdijkiae* para las variables medio y temperatura. GL: Grados de libertad, KW: Valor del estadístico Kruskal-Wallis, P: p-valor.

La esporulación en *A. westerdijkiae* fue similar en todos los casos excepto en el medio preparado a partir de uvas en el que la concentración de esporas se fue significativamente menor. Sin embargo, en el caso de *A. steynii* vemos dos medios con comportamiento estadísticamente distinto. En el medio de pimentón la esporulación fue mayor que en el resto, mientras que en el medio de uvas la concentración de esporas fue menor.

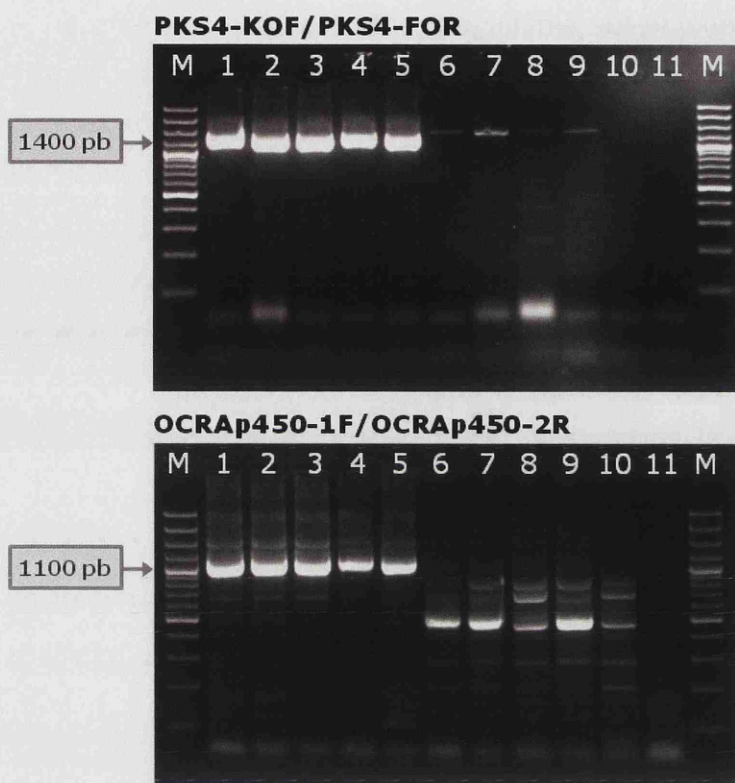
La esporulación de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* en medios basados en matrices alimentarias no se vio influenciada por la temperatura en ningún caso. La formación de esporas tampoco se modificó al variar la  $a_w$  en *A. westerdijkiae*, pero sí en *A. steynii* donde la concentración de esporas aumentó al incrementarse la  $a_w$ .

## **8. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. westerdijkiae***

### **8.1.- CARACTERIZACIÓN DEL AISLAMIENTO UTILIZADO EN LA DESCRIPCIÓN DE LOS GENES *pks* Y *p450-B03***

O'Callaghan *et al.* (2003, 2006) caracterizaron dos genes, *pks* y *p450-B03*, implicados en la síntesis de OTA en *A. ochraceus*. Sin embargo, estos trabajos fueron anteriores o contemporáneos al trabajo de Frisvad *et al.* (2004) en el que se describen nuevas especies en la sección Circumdati. La mayor parte de los aislamientos productores de OTA de *A. ochraceus* se han reclasificado como *A. westerdijkiae*, por lo que se comprobó a qué especie correspondía el aislamiento utilizado por los autores.

La comprobación de esta hipótesis se llevo a cabo mediante ensayos de PCR llevados a cabo tal y como se describe en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. La pareja de cebadores PKS4-KOF/PKS4-FOR amplifican una banda de aproximadamente 1400 pb del gen *pks*, y OCRAp450-1F/OCRAp450-2R un fragmento de unos 1100 pb del gen *p450-B03*. Los resultados obtenidos revelaron que únicamente se amplificaba una banda específica del tamaño esperado en el caso de que se estuviera utilizando DNA de *A. westerdijkiae*. Por tanto, se dedujo que el aislamiento utilizado en los trabajos de O'Callaghan *et al.* (2003, 2006) era en realidad una cepa de *A. westerdijkiae* y no de *A. ochraceus*. En la figura 3.18 se muestra un ejemplo de reacciones de PCR con DNA de alguna de las cepas de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* con las que se probó.



**Figura 3.18.** Amplificación por PCR con los cebadores PKS4-KOF/PKS4-FOR (arriba) y OCRAp450-1F/OCRAp450-2R (abajo). Carriles 1-5: *A. westerdijkiae* CECT 2948, CCT 6795, CCT 6810, CCT 6825, 3.58; carriles 6-10: *A. ochraceus* CECT 2093, CECT 2969, H5A, R1, PP8; carril 11: control negativo. M: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder.

## 8.2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *pks*, *p450-B03*, *aoks1* Y *nrps* EN *A. westerdijkiae*

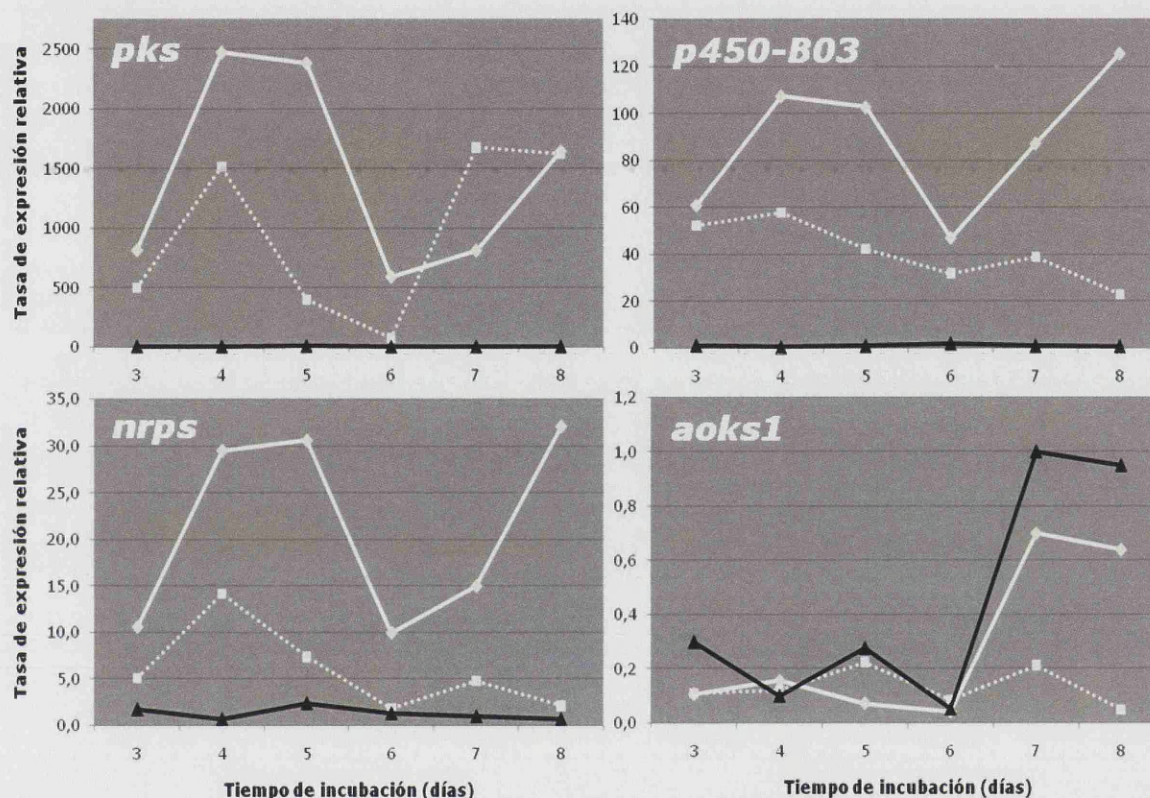
La expresión de los genes implicados en la síntesis de OTA en *A. westerdijkiae* se analizó mediante RT-PCR a tiempo real con ensayos diseñados en este trabajo. En primer lugar, se analizó la eficacia de amplificación mediante PCR a tiempo real de los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los genes implicados en la síntesis de OTA en *A. westerdijkiae*. Se realizaron curvas estándar con diluciones decimales de DNA de la cepa CECT 2948 obteniendo los valores de eficacia y coeficiente de correlación que se indican en la tabla 3.14. La mayor diferencia entre la eficacia de reacción del gen constitutivo y de los genes estudiados se obtuvo en el caso del gen *aoks1* y únicamente fue del 3%. Esto supone la posibilidad de utilizar el método de cuantificación relativa al no existir diferencias en las eficacias de más del 10% en ningún caso (Schmittgen & Livak, 2008).

	<i>Btub</i>	<i>pks</i>	<i>p450-B03</i>	<i>nrps</i>	<i>aoks1</i>
Eficacia (%)	95,0	94,0	92,0	95,7	97,0
R <sup>2</sup>	0,997	0,998	0,999	0,994	0,997

**Tabla 3.14.** Eficacia de reacción calculada a partir de la curva estándar generada con los cebadores diseñados para la amplificación de cada uno de los genes. Además se muestran los valores del coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) de cada una de ellas.



Los resultados de los niveles de expresión de los genes estudiados por las tres cepas de *A. westerdijkiae* se muestran en la figura 3.19. En todos los casos, la tasa de expresión para cada gen se representa con respecto a los resultados de la cepa no productora, 3.38, tras 7 días de incubación.



**Figura 3.19.** Tasa de expresión relativa de los genes analizados en este estudio para cada una de las cepas productoras CECT 2948 (línea blanca sólida) y 3.58 (línea blanca discontinua) y la para la cepa no productora (línea negra). Los resultados se representan con respecto a los de la cepa 3.38 tras 7 días de incubación. Los resultados son la media de los resultados de las dos réplicas evaluadas en placas independientes tras el correspondiente día de incubación.

Los mayores niveles de expresión, tanto en la cepa CECT 2948 como en 3.58, se obtuvieron en el caso del gen que codifica para la enzima poliquétido sintasa descrito por O'Callaghan *et al.* (2003), seguido del gen *p450-B03* que codifica para una citocromo p450 monooxigenasa. El gen *nrps* que codifica para una sintetasa de péptidos no ribosomales también se expresó a niveles elevados en ambas cepas productoras. Además, los perfiles de expresión de los tres genes a lo largo del tiempo es similar en cada una de las cepas. Por otro lado, los niveles de expresión de estos genes se relacionaron con la cantidad de OTA detectada en el medio cuantificada por HPLC. Los niveles de expresión de los genes *pks*, *p450-B03* y *nrps* fueron mayores en la cepa CECT 2948 y, como se puede comprobar en la tabla

3.15, este aislamiento produjo mayor cantidad de OTA que 3.58. No hubo expresión de ninguno de estos tres genes en el caso de la cepa que era incapaz de producir OTA. El análisis estadístico llevado a cabo comparando la expresión de estos tres genes, muestra que hay diferencias significativas entre las cepas productoras frente a la no productora.

	OTA ( $\mu\text{g/g}$ )	
	3.58	3.15
<b>Día 3</b>	0,37 $\pm$ 0,25	0,09 $\pm$ 0,07
<b>Día 4</b>	0,32 $\pm$ 0,19	0,24 $\pm$ 0,06
<b>Día 5</b>	5,18 $\pm$ 1,51	0,41 $\pm$ 0,09
<b>Día 6</b>	1,85 $\pm$ 1,75	0,25 $\pm$ 0,03
<b>Día 7</b>	2,35 $\pm$ 0,83	0,46 $\pm$ 0,39
<b>Día 8</b>	4,34 $\pm$ 3,44	0,13 $\pm$ 0,01

**Tabla 3.15.** Niveles de OTA medidos por HPLC en cada una de las cepas de *A. westerdijkiae* productoras estudiadas en el ensayo. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar de las dos réplicas analizadas en cada día.

En el caso del gen *aoks1* descrito por Bacha *et al.* (2009), la situación fue totalmente diferente. Los mayores niveles de expresión se obtuvieron en el caso de la cepa no productora 3.38, mientras que en las cepas productoras la expresión fue mucho menor. Por tanto, la expresión de este gen no se relaciona con la producción de toxina en estas condiciones. Además el análisis estadístico de los datos refleja que no hay diferencias significativas en la expresión de este gen entre las cepas productoras y la no productora.

## 9. CARACTERIZACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. steynii*

### 9.1.- CARACTERIZACIÓN DE UN GEN QUE CODIFICA PARA UNA CITOCROMO P450 MONOOXIGENASA

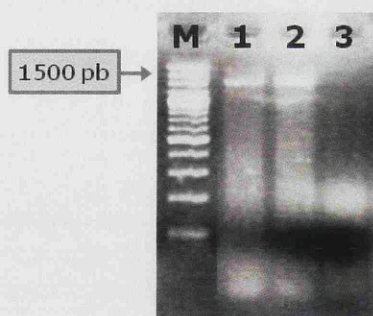
La amplificación de DNA de *A. steynii* con la pareja de cebadores OCRap450F y p450OCRAR, produjo un fragmento de 58 pb y, por tanto, de similar longitud que el obtenido en *A. westerdijkiae* (Figura 3.20). La secuencia obtenida tenía un 93% de identidad con la secuencia del pequeño fragmento del gen *p450-B03* de *A. westerdijkiae*.





**Figura 3.20.** Amplificación por PCR con los cebadores OCRAp450F y p450OCRAR en *A. steynii* y *A. westerdijkiae*. Carriles 1-5: *A. steynii* 3.53, Aso2, H7A, CBS 112812, CBS 121991; carriles 6-9: *A. westerdijkiae* 3.58, CCT 6795, CCT 6810, CCT 6825; carril 10: control negativo. M: Marcador de peso molecular GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.

Para conseguir la secuencia completa del gen se utilizó la técnica 5'-RACE siguiendo los pasos que se describen en el apartado 6.3.1 de la sección Materiales y Métodos. La banda obtenida al final del protocolo se muestra en la figura 3.21 y presentaba entre 1400 y 1500 pb. Este tamaño era el que se esperaba, ya que sería similar al del gen *p450-B03* en *A. westerdijkiae*. La banda visualizada en el gel de agarosa se recortó y clonó en un vector pGEM-T® para su posterior secuenciación. Debido a la gran longitud del fragmento clonado, se realizaron tres rondas de secuenciación utilizando, a parte de los cebadores universales, otros diseñados a partir de las secuencias parciales del gen que iban obteniéndose. Las secuencias de estos cebadores son 5'-GCCTCGGTGATATCAGGCGTAT-3' (RACEp450sec1) y 5'-GAGCGTGGCGAAGGCAGACT-3' (RACEp450sec2).

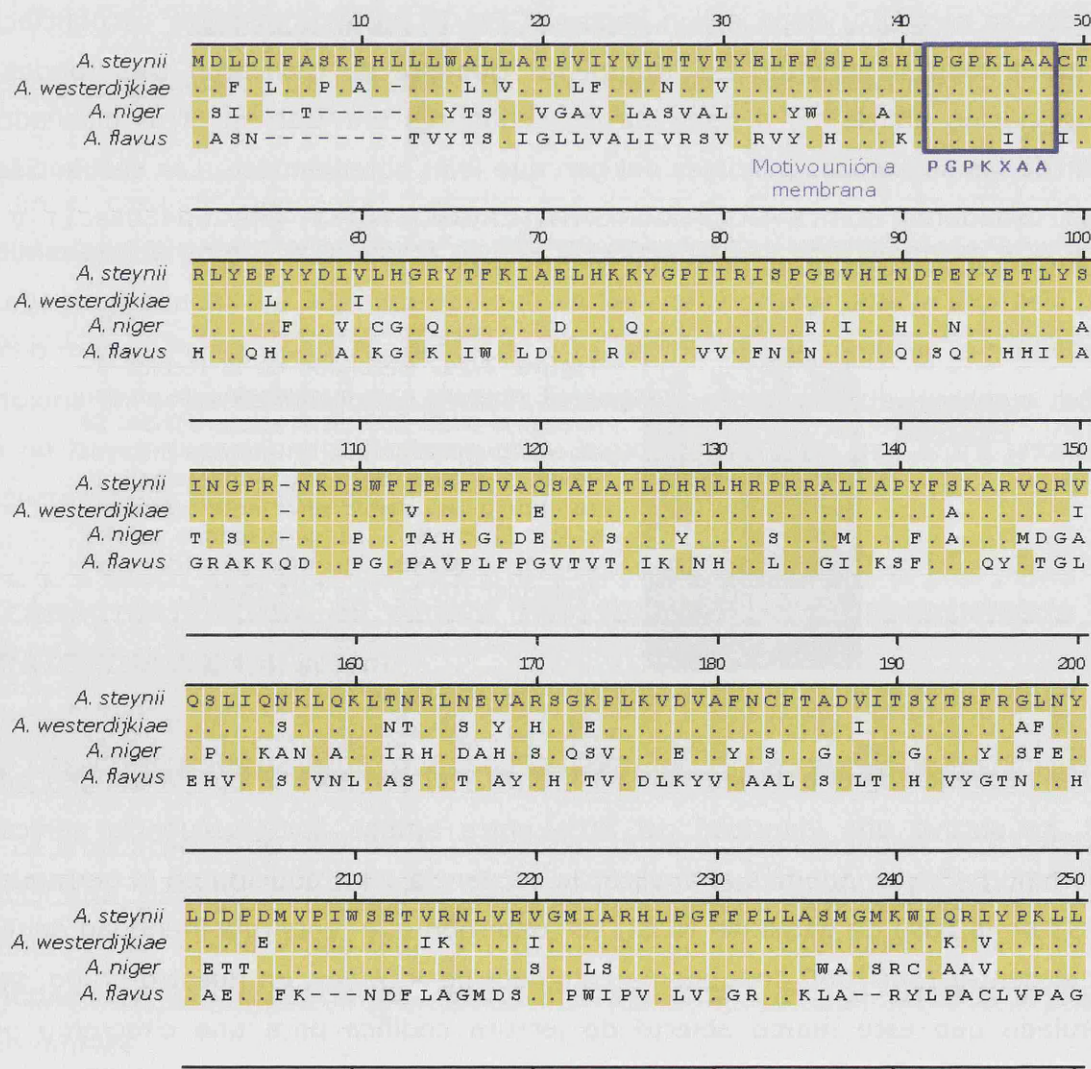


**Figura 3.21.** Resultado de la técnica 5'-RACE utilizada para la obtención de un gen similar al *p450-B03* de *A. westerdijkiae*. Se puede comprobar que en los dos ensayos llevados a cabo de manera independiente se obtuvo una banda semejante (carriles 1 y 2). El carril 3 se corresponde con el control negativo. M: marcador de peso molecular 100 bp Plus DNA Ladder.

La secuencia final obtenida tenía 1436 pb y al compararla con la del gen *p450-B03*, se obtuvo una identidad del 80% entre ambas. Esta secuencia génica se denominó *p450ste*. Además al analizar la secuencia e introducirla en la herramienta BLAST de la base de datos del NCBI, se comprobó que tenía una identidad del 66% con el gen *An15g07900* del genoma completo de *A. niger*. En nuestro grupo, se ha postulado que este marco abierto de lectura codifica para una citocromo p450 monooxigenasa (P450) y se encuentra rodeado de genes que codifican para



proteínas frecuentemente implicadas en los clusters de producción de micotoxinas, por lo que podría ser un gen implicado en la síntesis de OTA en *A. niger* (González-Salgado, 2009). Por otro lado, al introducir la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia del gen *p450ste* en la base de datos del NCBI, la herramienta BLAST reconoció los dominios conservados de la proteína y la clasificaba como perteneciente a la superfamilia de las citocromo p450. En la figura 3.22 se muestra el alineamiento de las tres hipotéticas proteínas que se obtendrían a partir de los marcos abiertos de lectura de los tres genes anteriormente mencionados de *A. steynii*, *A. westerdijkiae* y *A. niger* junto con la secuencia de aminoácidos deducida del gen *CypA* del cluster de producción de aflatoxinas en *A. flavus* que también codifica para una P450. La igualdad entre las secuencias proteicas de las tres primeras es superior a la encontrada en las secuencias de nucleótidos y se sitúa en un 86,2% entre la secuencia de las P450 de *A. steynii* y *A. westerdijkiae* y en un









de la proteína correspondiente implicada en la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* (Figura 3.22).

### 9.2.- CARACTERIZACIÓN DE UN GEN QUE CODIFICA PARA UNA CLOROPEROXIDASA

En los ensayos de PCR convencional llevados a cabo con cebadores diseñados a partir de la secuencia del gen que codifica para una cloroperoxidasa en *P. nordicum* (Geisen *et al.*, 2006) se obtuvo una única banda de aproximadamente 500 pb cuando se utilizaba DNA de *A. steynii* (Figura 3.23).



**Figura 3.23.** Amplificación por PCR con los cebadores otachl-F/otachl-R. Carriles 1-2: *A. steynii* 3.53, Aso2; carril 3: *P. nordicum* BFE 487, carril 4: control negativo. M: Marcador de peso molecular 2-log DNA Ladder

Tras la secuenciación de la banda obtenida se comprobó que la identidad con el gen que codifica para la enzima cloroperoxidasa en *P. nordicum* era de un 75% . Por tanto, se diseñaron cebadores para el análisis de la expresión de este gen en *A. steynii* mediante PCR a tiempo real para comprobar si podría estar implicado en la síntesis de OTA en esta especie.

### 9.3.- CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA POLIQUÉTIDO SINTASAS

En las reacciones de PCR convencional realizadas con las parejas de cebadores PKS4-KOF/PKS4-FOR y Aoks1/Aoks1R, con las condiciones de amplificación que se describen en los apartados 6.1 y 6.3.2 de Materiales y Métodos, respectivamente, se obtuvo amplificación positiva utilizando DNA de *A. steynii*. En el caso de los cebadores que amplifican el gen *pks* (PKS4-KOF/PKS4-FOR) se obtuvo una única banda de amplificación de aproximadamente 1200 pb al utilizar DNA de *A. steynii*, que coincidía con el tamaño de la banda obtenida al amplificar DNA de *A. westerdijkiae* (Figura 3.24).



**Figura 3.24.** Amplificación por PCR con los cebadores PKS4-KOF/PKS4-FOR. Carriles 1-2: *A. steynii* 121993, Aso2; carril 3-4: *A. westerdijkiae* CECT 2948, CBS 589.68, carril 5: control negativo. M: Marcador de peso molecular GenRuler™ 100bp Plus DNA Ladder.

La banda obtenida se clonó y secuenció como se indica en el apartado 6.3.1 de la sección Materiales y Métodos. La identidad de la secuencia obtenida con la del gen *pks* de *A. westerdijkiae* fue de un 99% por lo que se seleccionó para llevar a cabo estudios de PCR a tiempo real para el estudio de su expresión.

En el caso de la amplificación por PCR de DNA genómico de *A. steynii* con los cebadores Aoks1/Aoks1R, se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 1100 y 1300 pb (Figura 3.25). Ambas bandas se recortaron y clonaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.1.4 de Materiales y Métodos y las secuencias obtenidas se introdujeron en la herramienta BLAST proporcionada por el NCBI. Mientras que la secuencia de 1300 pb no tenía relación más que con secuencias no caracterizadas de los genomas completos de distintos hongos del género *Aspergillus*, la secuencia de la banda de 1100 pb tenía una identidad del 99% con la secuencia del gen *aoks1* de *A. westerdijkiae*. Por esto, también se diseñó un protocolo de PCR a tiempo real para estudiar si su expresión podría estar relacionada con la síntesis de OTA en *A. steynii*.



**Figura 3.25.** Amplificación por PCR con los cebadores Aoks1/Aoks1R. Carriles 1-3: *A. steynii* 121993, Aso2, 3.53; carril 4: *A. westerdijkiae* CECT 2948, carril 5: control negativo. M: Marcador de peso molecular GenRuler™ 100bp Plus DNA Ladder.

#### 9.4.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

El diseño de los cebadores específicos utilizados en los ensayos de PCR a tiempo real para el estudio de la expresión de los genes caracterizados se realizó a partir de las secuencias obtenidas previamente según se describe en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen *aoks1* en *A. steynii* fueron los mismos que los utilizados en el caso del análisis de la expresión de ese gen en *A. westerdijkiae* debido a la igualdad de las secuencias en

esa zona. La secuencia de todos los cebadores se muestran en la tabla 3.16. Todas las parejas de oligonucleótidos fueron probadas mediante PCR convencional con las condiciones indicadas en el apartado 3.2.2 de la sección Materiales y Métodos. Mientras que las parejas p450steQ1/p450steQ2 y chlF/chlR amplificaron una banda del tamaño esperado al utilizar DNA o cDNA de *A. steynii*, con los cebadores diseñados a partir de la secuencia de los genes que codificaban para enzimas del tipo PKS no se obtenía ninguna banda de amplificación. La estructura secundaria de estos dos genes se analizó mediante un programa informático a la temperatura de hibridación de los cebadores y no se obtuvo evidencia que se produjese ningún tipo de bucle o apareamiento inespecífico de bases que impidiera la unión de los cebadores.

Gen Amplificado	Cebador	Secuencia
$\beta$ -tubulina ( <i>btub</i> )	BTUBQsteF BTUBQsteR	5'- GCCGTTCTCGTCGACCTTGAG-3' 5'- CTGACCGAAGACGAAGTTGTGCG-3'
Poliquétido sintasa ( <i>stepks</i> )	PKSQSTEF PKSQSTER	5'-GAGACCCCTTGCGGATCAACC-3' 5'-CATGCCAAATGTGCGCAGGAT -3'
Cloroperoxidasa ( <i>chl</i> )	STEQchlF STEQchlR	5'- CAGCCCTTTCACCTGGCTCA-3' 5'- GGCCGTCGTGCTTCCCGATT-3'
Citocromo p450 monooxigenasa ( <i>p450ste</i> )	QSTEp4501 QSTEp4502	5'-ACCATCGCTTACACAGACCTC -3' 5'-GGAGCGTGCAACCTCGTTCA-3'

**Tabla 3.16.** Parejas de cebadores utilizadas para el estudio de la expresión de genes posiblemente implicados en la síntesis de OTA en *A. steynii* mediante PCR a tiempo real. En la tabla se reflejan su nombre y su secuencia.

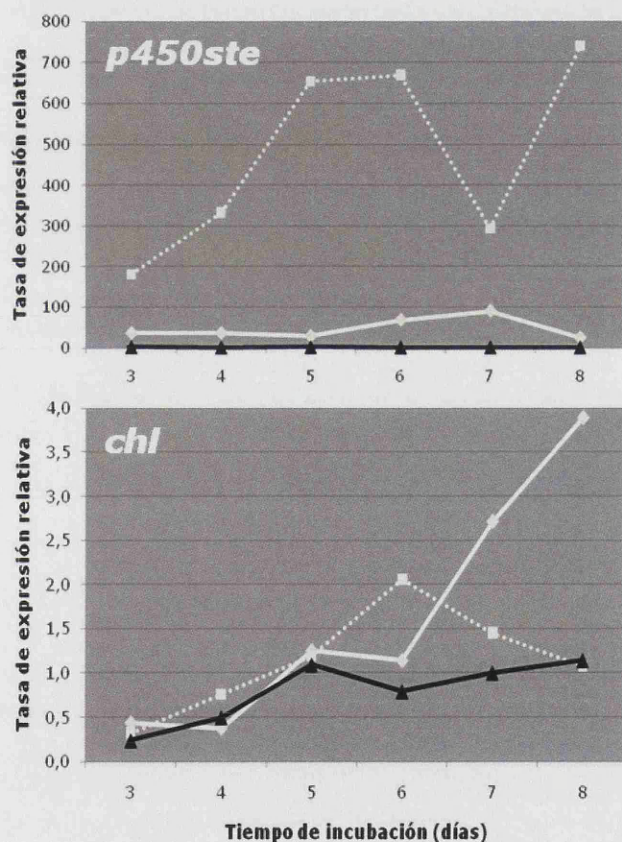
Debido a los problemas encontrados, únicamente se pudo realizar el análisis de la expresión de los genes *p450ste* y *chl*. Para la normalización de los resultados se eligió de nuevo la expresión del gen *btub*. En primer lugar, se analizó la eficacia de amplificación de los cebadores diseñados a partir de estos genes mediante PCR a tiempo real. Se realizaron curvas estándar con diluciones decimales de DNA de la cepa 3.53 obteniendo los valores de eficacia y coeficiente de correlación que se indican en la tabla 3.17. Las diferencias entre la eficacia de amplificación de los genes de estudio con respecto a la obtenida para el gen constitutivo no supero en ningún caso el 10%, por lo que, igual que en los casos anteriores, para el análisis de los resultados se utilizó el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Schmittgen & Livak, 2008).



	<i>βtub</i>	<i>p450ste</i>	<i>chl</i>
Eficacia (%)	97,0	93,4	92,3
R <sup>2</sup>	0,994	0,998	0,999

**Tabla 3.17.** Eficacia de reacción calculada a partir de la curva estándar generada con los cebadores diseñados. Además se muestran los valores del coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) para cada una de ellas.

Los niveles de expresión de los genes estudiados, *p450ste* y *chl*, en las tres cepas estudiadas se muestran en la figura 3.26. En todos los casos, la tasa de expresión para cada gen se indica con respecto a los resultados de la cepa no productora, CBS 112813, tras 7 días de incubación.



**Figura 3.26.** Tasa de expresión relativa de los genes analizados en este estudio, *p450ste* (arriba) y *chl* (abajo) para cada una de las cepas productoras 3.53 (línea blanca sólida) y Aso2 (línea blanca discontinua) y para la cepa no productora (línea negra). Los resultados se muestran con respecto a los valores obtenidos por la cepa CBS 112813 tras 7 días de incubación. Los resultados son la media de los datos de las dos réplicas evaluadas tras el correspondiente día de incubación.

La expresión del gen *p450ste* en las dos cepas productoras de OTA fue significativamente mayor que en la cepa no productora, CBS 112813, donde no se obtuvo señal detectable en ningún caso. Los niveles de expresión fueron más de 700 veces mayores en el caso de la cepa Aso2 y de 90 veces en el caso de 3.53. Los niveles de concentración de OTA detectada en medio CYA tras los distintos días de incubación se muestran en la tabla 3.18. Se puede comprobar cómo la cepa Aso2 es la que más toxina acumuló en el medio y, como se acaba de comentar, es la que

alcanzó mayores niveles de expresión del gen *p450ste*. Por otro lado, la cepa 3.53 produjo menor cantidad de OTA en estas condiciones así como no expresó el gen a niveles tan elevados. Además, el análisis de los datos llevado a cabo señaló que había diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de este gen en el caso de las cepas productoras con respecto a la no productora.

	OTA ( $\mu\text{g/g}$ )	
	3.53	3.53
<b>Día 3</b>	13,95 $\pm$ 1,57	16,16 $\pm$ 6,39
<b>Día 4</b>	38,01 $\pm$ 2,78	38,13 $\pm$ 3,89
<b>Día 5</b>	48,87 $\pm$ 6,65	94,51 $\pm$ 24,21
<b>Día 6</b>	62,35 $\pm$ 0,02	140,97 $\pm$ 15,79
<b>Día 7</b>	68,42 $\pm$ 1,25	131,44 $\pm$ 6,10
<b>Día 8</b>	100,81 $\pm$ 2,87	97,32 $\pm$ 39,57

**Tabla 3.18.** Niveles de OTA medidos por HPLC en cada una de las cepas de *A. steynii* productoras estudiadas en el ensayo. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar de las dos réplicas analizadas en cada día.

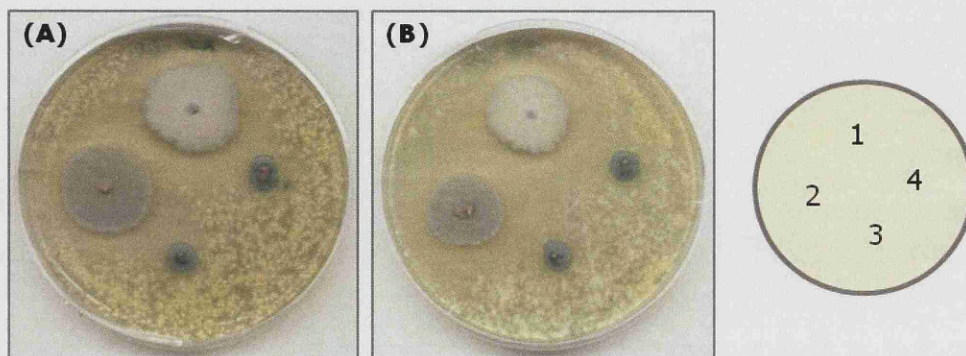
Los niveles de expresión del gen *chl* no son tan elevados como los encontrados en el caso de *p450ste* en ningún caso. Por otro lado, el análisis estadístico muestra que no hay diferencias en la expresión de este gen entre las cepas productoras, Aso2 y 3.53, y la no productora CBS 112813.

## 10. CONTROL BIOLÓGICO DE *A. westerdijkiae* CON LEVADURAS. ESTUDIO DE *D. hansenii* CYC 1244 COMO UN POSIBLE AGENTE DE BIOCONTROL

### 10.1.- SELECCIÓN DE UN POSIBLE AGENTE BIOCONTROL FRENTE A *A. westerdijkiae*

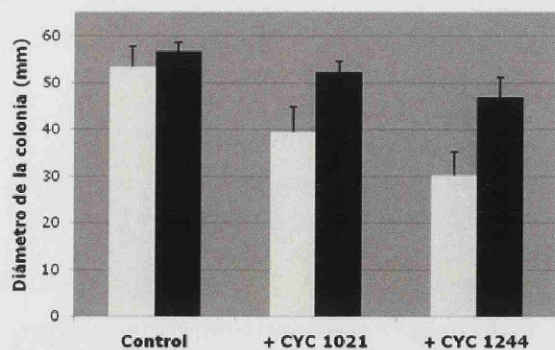
De los 16 aislamientos de levaduras ensayadas como posibles agentes de biocontrol frente a *A. westerdijkiae* y que se detallan en la tabla 2.4 de la sección Materiales y Métodos, únicamente dos cepas de la especie *D. hansenii*, CYC 1021 y CYC 1244, fueron capaces de inhibir la proliferación del hongo y hacer que apareciera un claro halo de inhibición del crecimiento en las cinco cepas probadas (Figura 3.27). La cepa CYC 1021 parecía afectar menos al crecimiento del hongo ya que el halo de inhibición era menor, pero la reducción en el crecimiento y/o en la producción de OTA por ambos posibles agentes biocontrol se cuantificó como se describe en el apartado 7.1 de la sección Materiales y Métodos.





**Figura 3.27.** Efecto biocontrol de distintas cepas frente a *A. westerdijkiae*. Se muestra como ejemplo dos placas de medio YMA-MB suplementado con NaCl con *A. westerdijkiae* ALF (A) y CECT 2948 (B). La localización de cada una de las levaduras inoculadas se indica en el esquema de la derecha y corresponden a *D. hansenii* CYC 1244 (1), CYC 1021 (2), CECT 10386 (3) y CECT 10380 (4). Se puede ver un halo de inhibición del crecimiento en ambas cepas de hongo alrededor de la zona de inoculación de *D. hansenii* CYC 1021 y CYC 1244.

En los ensayos llevados a cabo en medio CYA con la suspensión de las levaduras embebida en el medio, se pudo comprobar que la presencia tanto de *D. hansenii* CYC 1021 como CYC 1244 suponía una reducción en el crecimiento a las dos temperaturas ensayadas (Figura 3.28). Sin embargo, el mayor porcentaje de reducción se obtuvo con *D. hansenii* CYC 1244. *A. westerdijkiae* creció un 43,36% menos a 20 °C cuando estaba presente esta levadura y un 17,25% menos a 28 °C. En el caso de *D. hansenii* CYC 1021, los porcentajes de reducción fueron 26,17 y 7,2% a 20 y 28 °C, respectivamente.

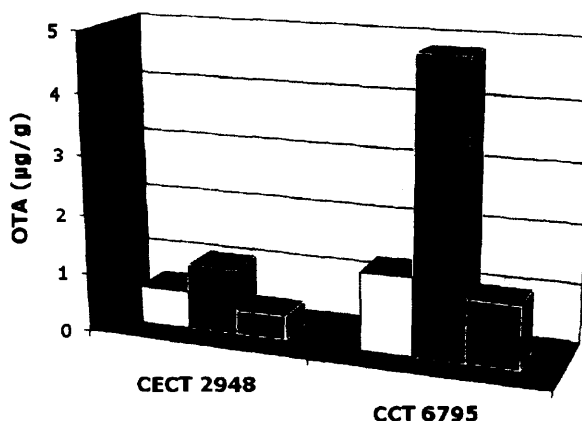


**Figura 3.28.** Efecto de la temperatura sobre la actividad antagonista de *D. hansenii* CYC 1021 y CYC 1244. Se representa la media del diámetro de crecimiento de las 5 cepas de *A. westerdijkiae* ensayadas a 20 °C (barras blancas) y a 28 °C (barras negras) en placas control de medio CYA o de medio CYA en el que se incluyó una suspensión de cada una de las levaduras. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Únicamente dos de las cepas de *A. westerdijkiae* utilizadas en este ensayo, CECT 2948 y CCT 6795, eran capaces de producir OTA. En las placas donde se cultivaron estos aislamientos se llevó a cabo la medida de la concentración de toxina por HPLC tal y como se describe en los apartados 4.2 y 4.3 de la sección Materiales y Métodos. A 20 °C los niveles de toxina estaban, en ambos casos, por debajo de los detectables, por lo que no se pudo valorar el efecto de la presencia de estas levaduras sobre la concentración de OTA en el medio. Los resultados obtenidos en

las placas incubadas a 28 °C se muestran en la figura 3.29. La interacción de *A. westerdijkiae* con las dos cepas de *D. hansenii* provocó efectos muy diferentes sobre la concentración de OTA detectada en el medio a 28 °C. Mientras que en presencia de *D. hansenii* CYC 1244 se produjo una reducción de la concentración de OTA en el medio con respecto a las placas control, en las placas donde se co-cultivo el hongo con *D. hansenii* CYC 1021 se produjo un incremento de la concentración de toxina de más del doble de la concentración detectada en las placas control.

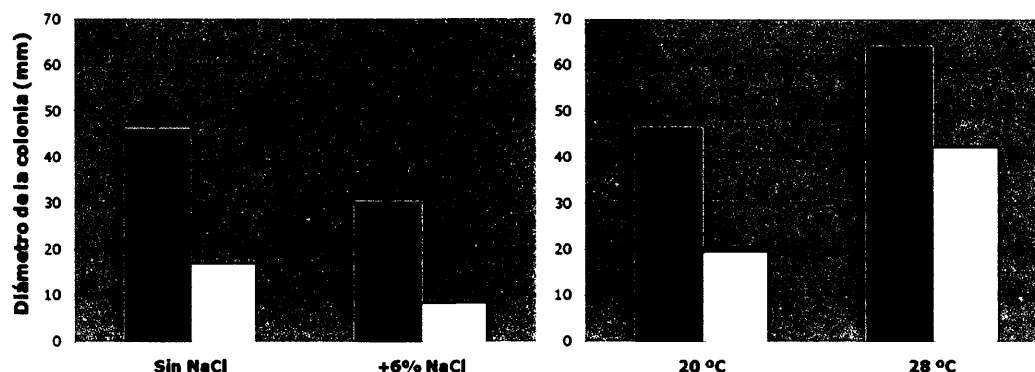
**Figura 3.29.** Efecto de la presencia de las dos cepas de *D. hansenii* seleccionadas sobre la concentración de OTA producida por *A. westerdijkiae* en medio CYA a 28 °C. Se representa la concentración de OTA detectada en las placas control sin levadura (barras blancas), placas con *D. hansenii* CYC 1021 (barras negras) y placas con *D. hansenii* CYC 1244 (barras grises) donde estaban creciendo *A. westerdijkiae* CECT 2948 y CCT 6795.



Por tanto, *D. hansenii* CYC 1244 se seleccionó para estudios posteriores como un posible agente de biocontrol frente a *A. westerdijkiae* ya que su presencia implicaba tanto una reducción en el crecimiento del hongo como una disminución de la concentración de OTA detectada en el medio.

#### 10.2.- EFECTO DE LA SALINIDAD Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE *D. hansenii* CYC 1244 FRENTE A *A. westerdijkiae*

La eficacia de *D. hansenii* CYC 1244 para controlar el crecimiento de *A. westerdijkiae* se vio significativamente potenciada por la adición al medio de cloruro sódico (6%) (Figura 3.30.A). El hongo crece significativamente menos cuando el medio estaba suplementado con cloruro sódico tanto en las placas control como en las que se incluía la levadura, pero el porcentaje de reducción del crecimiento de la colonia fue mayor en el caso del medio que contenía cloruro sódico. La presencia de *D. hansenii* CYC 1244 supone una reducción en el crecimiento del hongo del 63,1% en medio YMA-MB sin sal y un 72,1% en el caso de YMA-MB con un 6% de cloruro sódico.



**Figura 3.30.** Efectos de la concentración de cloruro sódico (A) y la temperatura (B) sobre la eficacia de *D. hansenii* CYC 1244 para reducir el crecimiento de *A. westerdijkiae*. Las barras negras representan el diámetro de crecimiento en las placas control y las barras blancas el crecimiento del hongo en las placas con la levadura. Se representan las medias de las tres réplicas de las cinco cepas de hongo ensayadas y las barras de error se corresponden con la desviación estándar de los datos.

El crecimiento de *A. westerdijkiae* en medio CYA se vio reducido de manera significativa a las dos temperaturas de incubación ensayadas debido a la presencia de *D. hansenii* CYC 1244. Sin embargo, cuando las placas se incubaron a 20 °C el porcentaje de disminución del diámetro de la colonia fue mayor (57,9%) que en el caso de las incubadas a 28 °C (34,1%) (Figura 3.30.B).

La presencia de *D. hansenii* CYC 1244 reduce los niveles de OTA por debajo de los detectables por el método en las placas de medio CYA donde estaban creciendo cualquiera de las dos cepas de *A. westerdijkiae* (CECT 2948 y CCT 6795) a 28 °C (Tabla 3.19). Ninguna de las dos cepas fue capaz de producir OTA a los 20 °C por lo que no se pudo evaluar el efecto de la levadura en estas condiciones.

		OTA (µg/g)
CECT 2948	Control	1,65±0,58
	+ CYC 1244	ND
CCT 6795	Control	3,04±1,81
	+CYC 1244	ND

**Tabla 3.19.** Efectos de la presencia de *D. hansenii* CYC 1244 sobre la concentración de OTA en placas de medio CYA donde crecían a 28 °C las cepas productoras de *A. westerdijkiae* ensayadas. Los resultados se muestran como la media de las tres réplicas de cada cepa ± la desviación estándar. ND: No detectado.



### 10.3.- ENSAYOS DE BIOCONTROL EN UVAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS

Para comprobar si *D. hansenii* CYC 1244 podría ser utilizada para la reducción del crecimiento de *A. westerdijkiae* en un sustrato natural, se realizó un ensayo con uvas artificialmente contaminadas tanto con el hongo como por la levadura. La presencia de *D. hansenii* CYC 1244 en la incisión que se realizó en las uvas y se contaminó con una suspensión de esporas de *A. westerdijkiae* reducía claramente el tamaño de la lesión (Figura 3.31). La reducción en el crecimiento del hongo que se producía por la presencia de la levadura en este sustrato natural se valoró mediante la detección de DNA de *A. westerdijkiae* utilizando el ensayo de PCR a tiempo real específico, tal y como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos.



**Figura 3.31.** Lesión producida por *A. westerdijkiae* CCT 6825 en uvas contaminadas sólo con hongo (izquierda) o con hongo y *D. hansenii* CYC 1244 (derecha).

La cantidad de hongo presente en la uva y, por tanto, el crecimiento de éste se valoró mediante el ensayo de PCR a tiempo real diseñado en esta tesis. En todas las cepas ensayadas se produjo un aumento de  $C_T$  en los casos en los que había co-infección de hongo y levadura, lo que se tradujo en una disminución del DNA detectado con respecto a los resultados de las uvas inoculadas sólo con *A. westerdijkiae* (tabla 3.20 y figura 3.32). En ningún caso se produjo una señal detectable en los controles inoculados únicamente con levadura o con suero salino estéril.

PROBLEMA		$C_T$
CCT 6795	Control	16,88
	+ CYC 1244	18,58
CCT 6825	Control	17,56
	+ CYC 1244	19,96
CECT 2948	Control	23,08
	+ CYC 1244	26,30
ALF	Control	19,92
	+ CYC 1244	20,40

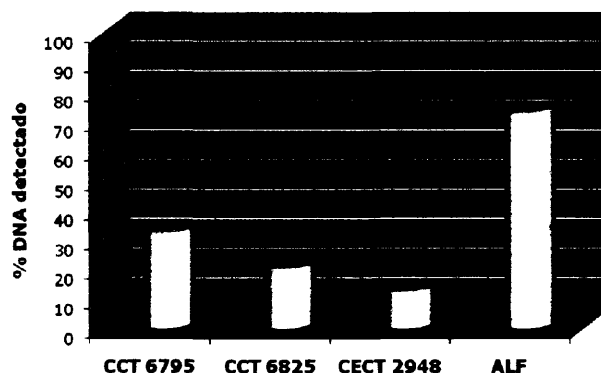
  

Control <i>D. hansenii</i> CYC 1244	28,89
Control Suero salino estéril	31,84
NTC	34,75

**Tabla 3.20.** Valores de  $C_T$  obtenidos en las reacciones de PCR a tiempo real llevadas a cabo con los DNAs aislados de las uvas inoculadas con cada una de las cepas de *A. westerdijkiae* (control) y con el hongo y *D. hansenii* CYC 1244 (+CYC 1244). Además, se muestran los valores de  $C_T$  obtenidos con DNA aislado de las uvas inoculadas únicamente con levadura o suero salino así como el valor del NTC.

Por tanto, la presencia de *D. hansenii* CYC 1244 produjo una reducción en el crecimiento de *A. westerdijkiae* en un sustrato frecuentemente contaminado por el hongo.

**Figura 3.32.** Porcentaje de DNA detectado de cada una de las cepas en las uvas co-inoculadas con cada una de las cepas de *A. westerdijkiae* y *D. hansenii* CYC 1244 mediante PCR a tiempo real con respecto a los valores obtenidos en los ensayos control inoculados solo con hongo.



#### 10.4.- EFFECTO DE LA TOXINA *killer* DE *D. hansenii* CYC 1244 SOBRE *A. westerdijkiae*

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos en medio YMA-MB tanto suplementado como no suplementado con un 6% de cloruro sódico en los que se enfrentó a *A. westerdijkiae* con un extracto purificado de la toxina *killer* de *D. hansenii* CYC 1244. Los resultados obtenidos revelaron que esta toxina no tenía actividad frente a *A. westerdijkiae*. En ninguna de las cuatro cepas ensayadas se pudo ver halo de inhibición de crecimiento del hongo alrededor del disco donde se había colocado el extracto de toxina purificado.

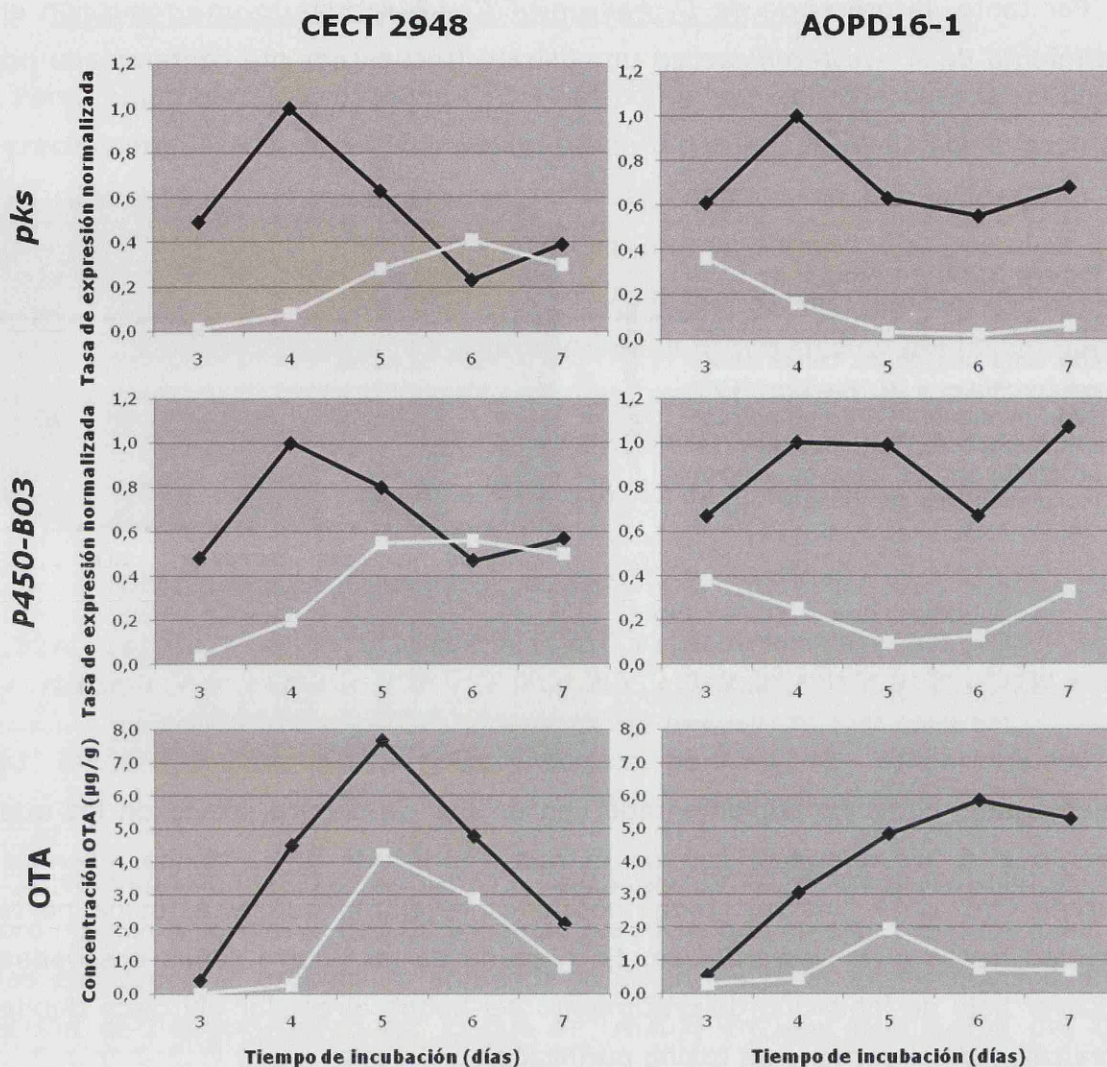
La actividad de la toxina *killer* purificada se comprobó realizando un ensayo similar con la levadura sensible *C. boidinii* CYC 1025. En las placas donde se inoculó esta cepa se observó un gran halo de inhibición del crecimiento de la misma alrededor del disco donde se había depositado el extracto de toxina *killer*.

#### 10.5.- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REDUCCIÓN DE LA OCRATOXINA A PRODUCIDA POR *A. westerdijkiae* DEBIDA A LA PRESENCIA DE *D. hansenii* CYC 1244

##### 10.5.1.- Disminución en la producción de OTA por *A. westerdijkiae*

Los resultados del análisis de expresión de los genes *pks* y *p450-B03* de las dos cepas de *A. westerdijkiae* analizadas se muestran en la figura 3.33. Los dos genes mostraron el mismo patrón de expresión en las placas control de las dos cepas (CECT 2948 y AOPD16-1). Se obtuvo un pico de expresión tras cuatro días de incubación con un posterior descenso de la misma hasta el día 6, cuando se produjo un nuevo incremento en la expresión hasta el final del ensayo. Sin embargo, la





**Figura 3.33.** Análisis de la expresión de los genes *pks* y *p450-B03* a lo largo del tiempo en las dos cepas de *A. westerdijkiae* estudiadas creciendo en placas de medio CYA (controles, líneas negras) o en placas con medio CYA y una suspensión celular de *D. hansenii* CYC 1244 (líneas blancas). Los resultados se muestran con respecto a los valores obtenidos en las placas control tras 4 días de incubación. Además se muestra la evolución de los niveles de OTA detectados en el medio expresados en µg OTA/g agar.

expresión de los genes implicados en la biosíntesis de OTA se vio fuertemente disminuida cuando el hongo se co-cultivaba con *D. hansenii* CYC 1244, aunque la respuesta a la presencia de la levadura en cada cepa fue diferente. Mientras que para *A. westerdijkiae* CECT 2948 se obtuvo un máximo de expresión a los 6 días de incubación, en el caso de AOPD16-1 los niveles de expresión de ambos genes disminuyeron gradualmente desde el día 3 hasta el final del experimento.

Si se comparan los máximos de expresión obtenidos por los hongos creciendo en placas control y en presencia de la levadura, se obtiene una disminución de un 41% y 54% en la expresión de los genes *pks* y *p450-B03* de la cepa CECT 2948, mientras que en la otra cepa la reducción fue de un 64% para el gen *pks* y un 62%

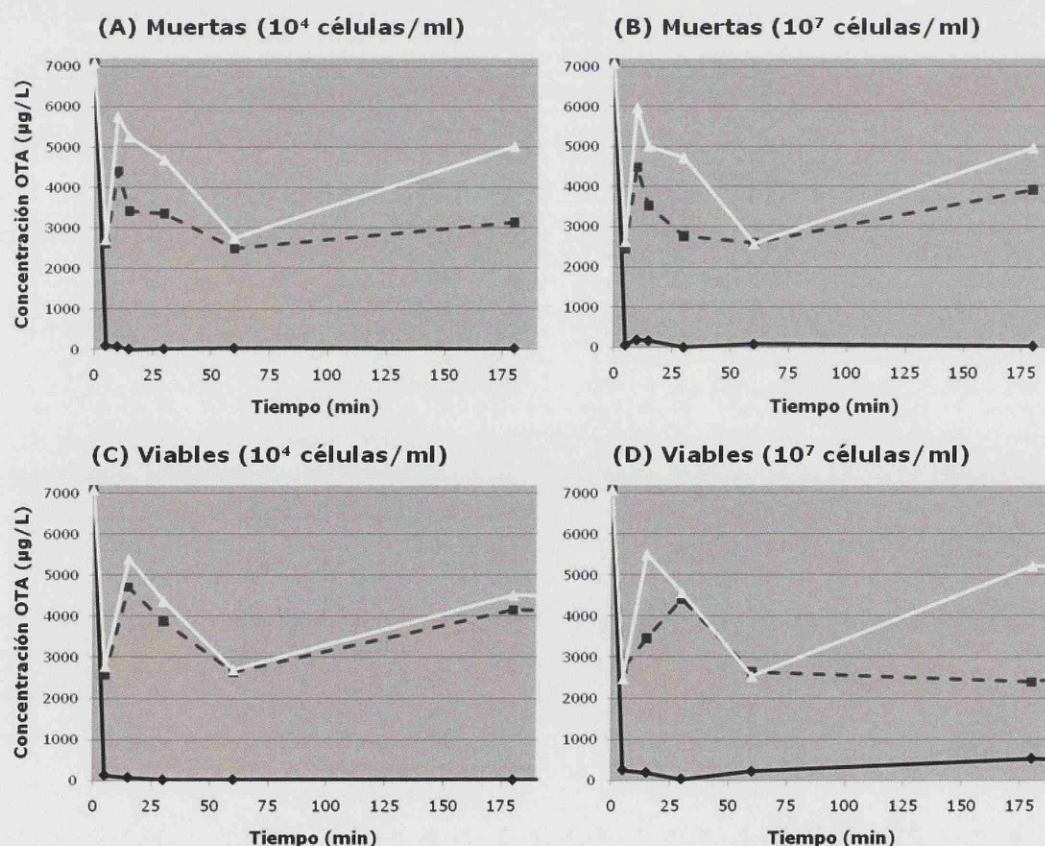


para el gen *p450-B03*. Por otro lado, en la figura 3.33 se puede apreciar el descenso que la concentración de OTA en el medio medida por HPLC en las dos cepas de *A. westerdijkiae* ensayadas.

#### 10.5.2.- Adsorción a la pared y/o absorción al interior celular de la levadura

El estudio de la posible eliminación del medio de la OTA producida por *A. westerdijkiae* por *D. hansenii* CYC 1244 se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.4.2 de la sección Materiales y Métodos. Se estudiaron tres parámetros distintos: estado de las células (viables o muertas por calor), concentración de células ( $10^4$  y  $10^7$  células/ml) y pH (3, 5 y 7).

El pH fue el factor más determinante de todos los ensayos. En la figura 3.34 se muestra su efecto en la eliminación de la OTA en todas las condiciones probadas a lo largo del tiempo. A todos los pH analizados se produjo una disminución estadísticamente significativa de la concentración de toxina en el extracto cuando la levadura estaba presente. Sin embargo, las diferencias a pH 3 son mucho más



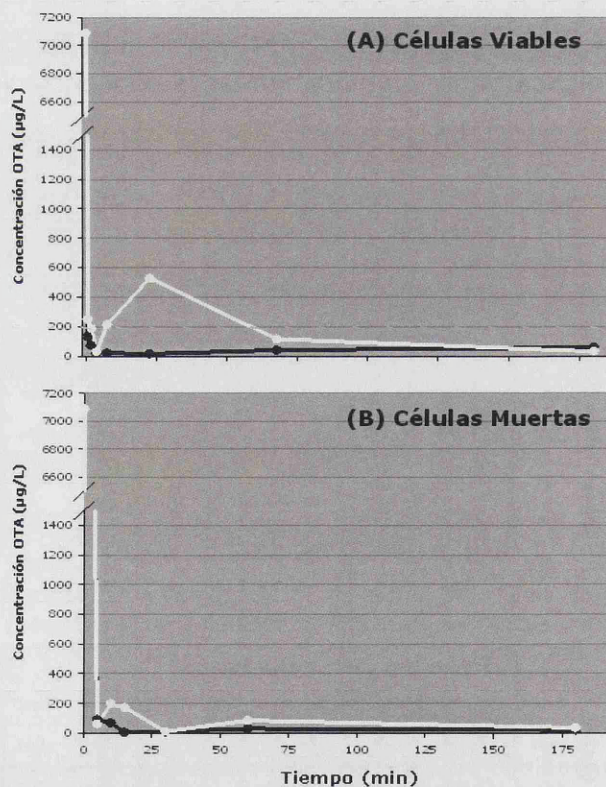
**Figura 3.34.** Efecto del pH en la eliminación de OTA del extracto por *D. hansenii* CYC 1244. Se muestran los resultados a pH 3 (líneas negras), pH 5 (líneas discontinuas) y pH 7 (líneas blancas) a lo largo del tiempo en todas las condiciones probadas de concentración y estado celular.



importantes. Tras 5 min de incubación a pH 3 se produjo una disminución drástica de más del 95% de la concentración de toxina inicial en el extracto en todas las condiciones celulares ensayadas, que se mantuvo más o menos estable a lo largo del experimento. Sin embargo, a los otros pH ensayados, 5 y 7, la reducción de OTA fue menos importante (alrededor del 60%) y se obtuvo una gran variabilidad de los niveles de toxina en el extracto a lo largo del tiempo.

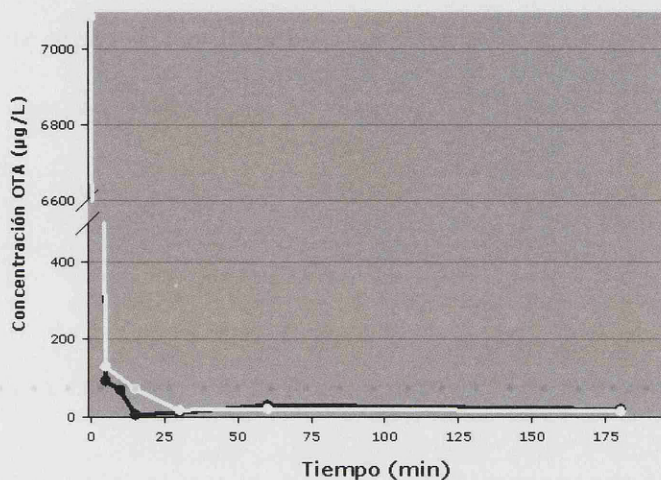
La concentración de células no afectó de manera significativa a la eliminación de OTA por parte de *D. hansenii* CYC 1244. En la figura 3.35 se puede apreciar como los niveles de OTA en el extracto a lo largo del tiempo fueron semejantes a las dos concentraciones de células probadas tanto cuando estaban presentes células viables como muertas por calor.

**Figura 3.35.** Efecto de la concentración y del estado celular sobre la eliminación de OTA por *D. hansenii* CYC 1244. Las líneas blancas se corresponden con los resultados con extractos  $10^7$  células/ml y las negras con extractos que contenían  $10^4$  células/ml. Se muestran los resultados obtenidos con las células viables (A) y muertas (B) a pH 3.



El estado de las células tampoco afectó a la eliminación de OTA del extracto por parte de la levadura de estudio. No hay evidencias estadísticamente significativas de que las levaduras vivas reduzcan más el contenido de toxina que las muertas ni viceversa. En la figura 3.36 se representa la evolución a lo largo del tiempo de la concentración de OTA en los extractos con células muertas y viables. Se puede ver como ambos perfiles siguieron prácticamente la misma trayectoria durante todo el experimento.





**Figura 3.36.** Efecto del estado de las células en la eliminación de OTA por *D. hansenii* CYC 1244. Se representa la reducción de OTA debida a células viables (línea blanca) y muertas por calor (línea negra) en condiciones de  $10^4$  células/ml y pH 3.

### 10.5.3.- Degradación de ocratoxina A por *D. hansenii* CYC 1244

Por otro lado, se estudió si *D. hansenii* CYC 1244 era capaz de degradar la OTA y transformarla en otras moléculas. Los resultados obtenidos tras el procesamiento de los extractos de OTA según se describe en el apartado 7.4.3 de la sección Materiales y Métodos se muestra en la tabla 3.21.

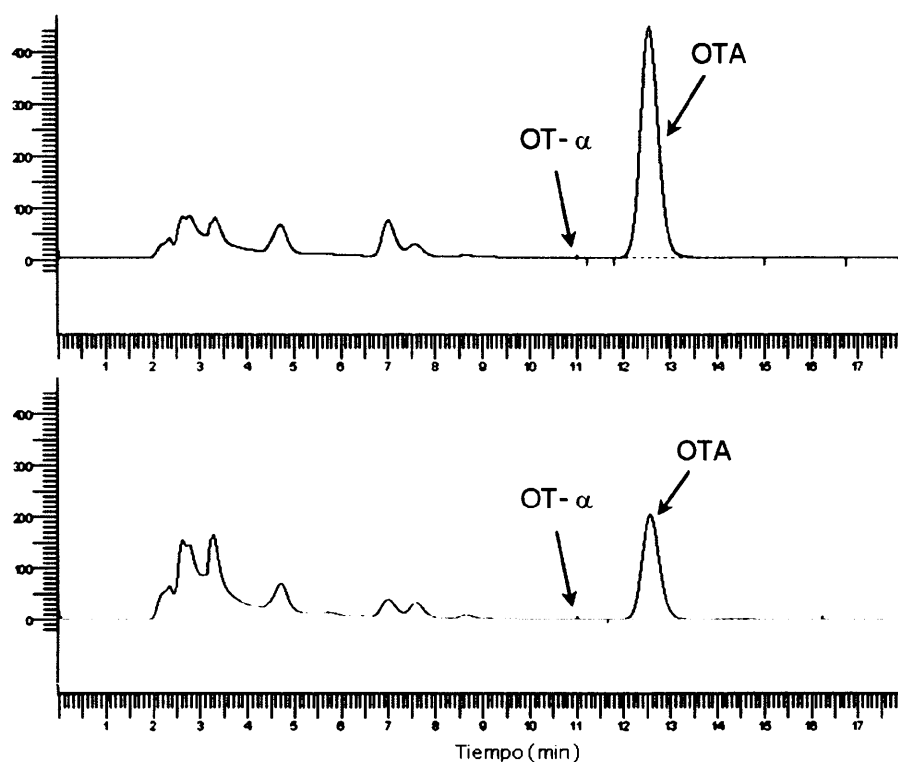
	Concentración OTA (µg/L)
Control	6207,9 ± 25,1
24 h	6480,8 ± 17,5
48 h	6543 ± 61,7

**Tabla 3.21.** Concentración de OTA en los extractos mezclados con medio YMA donde había crecido previamente *D. hansenii* CYC 1244 tras 24 y 48 h de incubación. Como control se mezcló el extracto de OTA con medio YMB sin inocular. Los valores son la media de las dos réplicas de cada ensayo ± la desviación estándar.

Los resultados tras la incubación de los extractos de OTA con el medio donde previamente había crecido la levadura no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el ensayo control ni tras 24 h ni tras 48 h ( $p > 0,05$ ). Esto descarta la hipótesis de que *D. hansenii* CYC 1244 excrete alguna molécula que pueda degradar la toxina.

Además, el estudio de los cromatogramas no reveló la aparición del producto de degradación más frecuente de la OTA, la OTA- $\alpha$ , lo que afianza la idea de que este mecanismo no está implicado en la reducción de OTA en los extractos por parte de

la levadura. Un ejemplo de cromatogramas de los extractos obtenidos de una placa control y otra con un co-cultivo de *A. westerdijkiae* y *D. hansenii* CYC 1244 se muestra en la figura 3.37.



**Figura 3.37.** Cromatogramas de los extractos obtenidos de una placa control de *A. westerdijkiae* AOPD16-1 en medio CYA (arriba) y de un co-cultivo de este hongo con *D. hansenii* CYC 1244 (abajo), ambos tras 6 días de incubación. Se señala el pico correspondiente a la OTA y donde debería estar el pico de la OT- $\alpha$ .

Discusión





# 1. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES TOXÍGENAS DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI

## 1.1.- ENSAYOS DE PCR ESPECÍFICOS PARA *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ochraceus* Y *Aspergillus steynii*

Uno de los objetivos planteados en esta tesis fue el desarrollo de ensayos de PCR específicos para detectar y diferenciar las tres especies ocratoxígenas más importantes incluidas dentro de la sección Circumdati. Durante mucho tiempo, *A. ochraceus* fue descrita como la principal productora de OTA no sólo de la sección, sino también una de las más importantes dentro del género *Aspergillus*. Frisvad *et al.* (2004) describieron nuevas especies incluidas en la sección Circumdati tras realizar un estudio filogenético basado en secuencias del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina (*Btub*) aunque utilizaron una pequeña cantidad de aislamientos. Algunos autores defienden la teoría de que el análisis de esta secuencia de manera aislada no es una herramienta eficaz para la identificación filogenética de especies en el género *Aspergillus* y que son mucho más apropiadas las aproximaciones basadas en varios loci (Geiser *et al.*, 2007). Por esto, nos planteamos el estudio de los aislamientos de la sección Circumdati de los que disponíamos hasta el momento obteniendo las secuencias del gen *Btub* y de la región ITS1-5,8S-ITS2 de todos ellos, para comprobar si la descripción de las nuevas especies realizada por Frisvad *et al.* (2004) realmente tenía una base filogenética. El resultado del análisis filogenético realizado en esta tesis concuerda de manera general con lo que previamente había sido publicado, de forma que cada una de las especies analizadas ocupaba una rama independiente del árbol generado por máxima parsimonia. Además, hay que destacar que los valores de *bootstrap* obtenidos fueron mucho más altos que los indicados por Frisvad *et al.* (2004), por lo que se refuerza la hipótesis que las filogenias multilocus tienen mayor consistencia que las realizadas basándose en una única región génica. Posteriormente, en el trabajo publicado por Peterson (2008) se volvió a comprobar la consistencia filogenética de las nuevas especies descritas.

Todos estos estudios filogenéticos llevados a cabo recientemente han hecho necesaria una revisión en los métodos de diagnóstico desarrollados con anterioridad para que sea posible la discriminación entre las nuevas especies descritas que han destacado como importantes productoras de OTA.

La PCR convencional se ha aplicado con éxito para la detección de especies ocratoxígenas del género *Aspergillus* en nuestro grupo (González-Salgado *et al.*,

2005; Patiño *et al.*, 2005). El diseño de los cebadores en la región multicopia ITS1-5,8S-ITS2 hace que el ensayo sea altamente sensible si se compara con los basados en secuencias de copia única. Por ejemplo, los ensayos desarrollados con cebadores diseñados en la secuencia del gen de la calmodulina publicados por Perrone *et al.* (2004) y Susca *et al.* (2007) para la discriminación de distintas especies ocratoxígenas necesitaban 35 ciclos para obtener una señal significativa. Sin embargo, en nuestro caso, bastan entre 21 y 23 ciclos dependiendo de la especie que se esté analizando, lo que reduce en más de una hora el protocolo de amplificación. Además, el aumento de la sensibilidad es una ventaja importante a la hora de detectar las especies de estudio en matrices alimentarias. Durante la extracción de DNA de las muestras contaminadas, gran parte del material genético aislado se corresponde con el DNA de la matriz, mientras que únicamente una pequeña cantidad pertenece a los hongos contaminantes. Sin embargo, la alta sensibilidad de los protocolos descritos hace que con la presencia de muy poco DNA fúngico se pueda obtener una banda de amplificación que indique la contaminación del alimento por *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* o, en su caso, *A. steynii*.

Las regiones ITS presentan gran variabilidad interespecífica dentro el género *Aspergillus* (Edwards *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2006; El Khoury & Atoui, 2010). Las tres especies estudiadas en este trabajo pertenecen a la misma sección, por lo que están muy estrechamente relacionadas filogenéticamente y sólo presentan pequeñas variaciones en sus regiones ITS1-5,8S-ITS2, existiendo una identidad del 98% entre *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* y del 95% entre estas y *A. steynii*. Sin embargo, estos pocos cambios en la secuencia de nucleótidos han sido suficientes para el diseño de cebadores para cada una de ellas que, junto con los correspondientes programas de amplificación, nos proporcionan protocolos específicos para su detección y discriminación, sin tener que recurrir a los complejos métodos de identificación tradicional.

En nuestro grupo, se describió un ensayo de PCR convencional para la detección de *A. ochraceus* (Patiño *et al.*, 2005). Sin embargo, como se ha visto en esta tesis, muchos de los aislamientos que anteriormente estaban incluidos en esta especie deberían ser reclasificados actualmente como *A. westerdijkiae*. Por tanto, el ensayo fue re-evaluado y los resultados indicaron que los cebadores amplificaban una región de 400 pb tanto en DNA genómico de *A. ochraceus* como de *A. westerdijkiae*, mientras que no se observaba producto de amplificación al utilizar DNA de *A. steynii*.

Como ya se ha comentado, la utilización de los ensayos de PCR diseñados han permitido la identificación correcta de una gran variedad de aislamientos de distintos orígenes; por tanto, podrían ser herramientas muy útiles para las colecciones de cultivo tanto personales como institucionales, para la reclasificación de los aislamientos de *A. ochraceus* identificados previamente a la descripción de las nuevas especies

Estos rápidos y sensibles protocolos de PCR diseñados detectan específicamente las tres principales especies ocratóxigenas de *Aspergillus* sección *Circumdati*. Como se verá más adelante, la capacidad de producir la toxina de cada una de ellas difiere considerablemente, por lo que el riesgo de contaminación por OTA en los alimentos es muy distinto si es una especie u otra la que está presente. Por tanto, la detección de estas especies así como la discriminación precisa de *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* y *A. steynii* podrían mejorar el diagnóstico en las distintas etapas y en los puntos de control crítico de los sistemas integrados de APPCC.

#### 1.2.- ENSAYO DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *A. westerdijkiae* Y *A. ochraceus*

A parte de la detección de los hongos productores de OTA en las matrices alimentarias, en algunos casos es esencial la cuantificación de los niveles de contaminación ya que en estudios previos se ha visto que si superan un determinado umbral es muy posible que la concentración de OTA en el alimento exceda los límites legales (Lund & Frisvad, 2003). En esta tesis, se ha descrito un método sensible y específico para detectar y cuantificar *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* mediante PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I como sistema de detección. Además, el protocolo se ha probado en dos sustratos frecuentemente contaminados por estas especies como son el café verde y las uvas.

Como se ha explicado anteriormente, las regiones ITS presentan una gran variabilidad en el género *Aspergillus* y son adecuadas para el diseño de cebadores específicos (Edwards *et al.*, 2002). El alineamiento de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de numerosas cepas de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* reveló que únicamente diferían en unas pocas bases. Debido a las características especiales de los amplicones adecuados para PCR a tiempo real (tamaño, contenido en G+C, temperatura de fusión, etc.), únicamente se pudo diseñar un ensayo para la detección conjunta de ambas especies. Sin embargo, estas especies son consideradas dos de las principales productoras de OTA por lo que la presencia de cualquiera de ellas en un alimento supondría un alto riesgo de contaminación por la

toxina. La especificidad del ensayo se ha probado con éxito en un gran número de cepas mediante PCR convencional y no se observa amplificación con la pareja de cebadores diseñados OCRAQ1/OCRAQ2 en ningún caso, excepto cuando se utiliza DNA de *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae*.

La optimización de un ensayo de PCR a tiempo real es muy importante, principalmente cuando se usan agentes intercalantes como sistema de detección. El SYBR Green I se une de manera inespecífica al DNA de doble cadena por lo que si aparecieran dímeros de cebadores o se amplificaran productos inespecíficos se producirían resultados erróneos (Costa, 2004). En este caso, el análisis de la curva de disociación generada y de los parámetros calculados a partir de la curva estándar nos indican que el método diseñado está correctamente optimizado. La eficacia es un indicador de la fiabilidad del ensayo y la mayoría de los autores defienden que se debe encontrar entre 90 y 110% (Fraga *et al.*, 2008). En el ensayo diseñado utilizando los cebadores OCRAQ1 y OCRAQ2 la eficacia de la reacción es del 94%. Este parámetro junto con el alto coeficiente de correlación obtenido ( $R^2=0,998$ ) reafirman la idea de que se ha diseñado un ensayo robusto y reproducible. La derivada negativa de la curva de disociación muestra un único pico de disminución de fluorescencia, de lo que se deduce que se está amplificando un único fragmento específico y que no se forman dímeros de cebadores.

La especificidad del ensayo para la detección únicamente de *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* se comprobó mediante PCR a tiempo real utilizando muestras que contenían mezclas de DNA de los hongos de estudio con DNAs de otras especies filogenéticamente próximas o que habitualmente contaminan los mismos sustratos. En ningún caso se obtuvo amplificación con los cebadores OCRAQ1/OCRAQ2 si no había presente DNA de las especies de estudio. Además en el resto de muestras, los valores de DNA detectado se podían correlacionar con la concentración inicial de DNA de *A. westerdijkiae* o *A. ochraceus* que se utilizó en cada una de ellas. Por tanto, este ensayo no sólo es adecuado para la detección de estas especies sino también para su cuantificación.

Ya se ha comentado en varias ocasiones durante esta tesis que el rDNA se encuentra normalmente en varios cientos de copias en cada genoma. Esto hace que los ensayos de PCR a tiempo real basados en estas secuencias tengan una mayor sensibilidad que los diseñados a partir de secuencias de copia única como son los genes constitutivos o los implicados en la síntesis de micotoxinas (Suarez *et al.*, 2005; González-Salgado *et al.*, 2009). Schmidt *et al.* (2004) describieron un ensayo de PCR a tiempo real para la detección de *A. ochraceus* utilizando como secuencia

diana algunos genes implicados en la biosíntesis de OTA y establecieron como límite de detección 4,7 pg/reacción. Sin embargo, en el protocolo desarrollado en este trabajo se ha obtenido una sensibilidad de 2,5 pg/reacción utilizando secuencias de copia múltiple, reduciendo el límite de detección a la mitad. Actualmente, varios autores prefieren expresar la sensibilidad de los ensayos como el número de genomas haploides detectados (Mulè *et al.*, 2006; Selma *et al.*, 2008). Sin embargo, en este caso no ha sido posible porque, hasta el momento, no se conoce el peso molecular del genoma de ninguna de las especies de estudio, así como de otras muy relacionadas filogenéticamente.

El *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAgen, España) ya había sido utilizado con éxito para el aislamiento de DNA de hongos que contaminaban alimentos para su detección por PCR a tiempo real (Mayer *et al.*, 2003). La validez del método para la extracción de DNA fúngico en cultivo puro se comprobó realizando cinco extracciones independientes de dos cepas de *A. westerdijkiae* y una de *A. ochraceus*. Cuando se compararon los valores de concentración de DNA en cada caso que se obtuvieron al utilizar el espectrofotómetro Nanodrop o mediante el ensayo de PCR a tiempo real diseñado, se obtuvieron distintos rangos. En el primer caso se situaba entre 5-81 ng/μl y en el segundo entre 2-71 ng/μl. La diferencia en el límite inferior se puede deber a la sensibilidad del espectrofotómetro, ya que se indica que a valores pequeños la probabilidad de imprecisión es elevada. Por tanto, el método de cuantificación por PCR a tiempo real es el más adecuado cuando la concentración de DNA es muy pequeña. Sin embargo, en el caso del límite superior la diferencia se debió probablemente a un error en la cuantificación por PCR. Cuando la cantidad de DNA es muy grande, los reactivos se acaban rápidamente y la amplificación deja de producirse. En todo caso, esto no supone un problema para la utilización del método diseñado en la cuantificación de la contaminación por *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae* directamente en muestras debido a que la mayor cantidad del DNA aislado es de la matriz donde está creciendo el hongo.

Las matrices alimentarias tienen una estructura muy compleja por lo que es imprescindible optimizar los protocolos de extracción de DNA y PCR a tiempo real para comprobar que ningún componente de los alimentos pueda interferir en el diagnóstico de la contaminación de las especies fúngicas (Hanna *et al.*, 2005). Por ello, se probó si el mismo protocolo utilizado para el aislamiento de DNA de hongos era capaz de eliminar de manera eficiente la posible interferencia de algún componente de la matriz que pudiera inhibir los ensayos de PCR a tiempo real. Utilizando el *DNeasy Plant Mini kit* se obtenía DNA con un alto rendimiento en granos de café verde pero el protocolo tuvo que ser mejorado para la extracción de

DNA de uvas. Este sustrato presenta una elevada concentración de polifenoles que son, tras los azúcares y los ácidos orgánicos, los componentes más abundantes en esta matriz alimentaria (Dharmadhikari, 1994). Normalmente, estos compuestos no son eliminados durante la extracción de DNA y se ha demostrado que pueden interferir en el proceso de purificación de ácidos nucleicos debido a la desnaturalización de las enzimas líticas o las moléculas biológicas, lo que produce una disminución en el rendimiento del proceso (Kim *et al.*, 1997; Wilson, 1997). Además, los compuestos fenólicos causan problemas en las reacciones de PCR debido a que pueden desnaturalizar la polimerasa o unirse a ella impidiendo su correcta actuación (Wilson, 1997). La adición de PVP en el paso correspondiente como se indica en el apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos, mejoró el rendimiento del ensayo hasta valores semejantes a los obtenidos en el caso del café verde. Este polímero hidrosoluble se une a los polifenoles formando un complejo que precipita en el siguiente paso de centrifugación (John, 1992). Además, tras la modificación introducida en el protocolo de extracción de DNA utilizado, la presencia de DNA del hospedador no interfería en el ensayo de PCR a tiempo real diseñado en este trabajo.

Una vez que el protocolo estuvo optimizado, se comprobó si era adecuado para la detección de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* creciendo en las dos matrices alimentarias seleccionadas contaminadas artificialmente con suspensiones de esporas de concentración conocida. Este experimento es imprescindible a la hora de evaluar un protocolo para la detección molecular de cualquier microorganismo en un alimento para descartar la presencia de inhibidores de la reacción tras la extracción de DNA (Jaykus, 2003). Cuando las muestras eran inoculadas con una alta concentración de esporas ( $10^6$  esporas/ml), se obtuvo una señal detectable incluso sin incubación a 28 °C. La extracción de DNA directamente de esporas es difícil debido a la resistencia de su pared. Sin embargo, tras la colonización de los sustratos, las esporas germinan y normalmente aparecen en forma micelial lo que facilitaría la extracción de DNA y, por tanto, la detección de *A. ochraceus* o *A. westerdijkiae* mediante el ensayo de PCR a tiempo real incluso cuando los niveles de contaminación son muy bajos. Además, el ensayo de detección de las especies de estudio en uvas y café verde contaminados artificialmente apoya la hipótesis de que el protocolo puede ser usado para la cuantificación de los niveles de contaminación de estos hongos. En todos los casos, la detección de DNA fúngico aumentó a medida que avanzaba el tiempo de incubación en ambas matrices y a las distintas concentraciones de esporas utilizadas para la inoculación.

A modo de conclusión, se puede decir que se ha descrito un protocolo de PCR a tiempo real para detectar y cuantificar *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* en uvas y granos de café verde. Este método es rápido, específico y proporciona una mayor sensibilidad que los ensayos desarrollados hasta el momento, por lo que podría ser una buena estrategia en la detección temprana de estas especies ayudando a predecir la contaminación por OTA en alimentos susceptibles a la colonización por *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus*.

## **2. INCIDENCIA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI EN HARINA DE CEBADA Y PIMENTÓN**

### **2.1.- DETECCIÓN DE *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* Y *A. steynii* EN HARINA DE CEBADA**

Actualmente se considera a los cereales como la principal fuente de OTA de la dieta humana (Comisión Codex Alimentarius, 1999). La cerveza es una bebida consumida en todo el mundo que se prepara a partir de malta de cebada. En 2008, el consumo total de cerveza en el mundo alcanzó los 178 mil millones de litros, aumentando los datos del año anterior por 23º año consecutivo (KIRIN, 2009). En este informe, se destaca a Europa y Asia como las principales regiones consumidoras al suponer más del 60% del consumo mundial. En un reciente estudio se señala a España como el noveno país mundial productor de esta bebida con más de 3 mil millones de litros fabricados en 2009 (KIRIN, 2010). Los hongos ocratoxígenos tienden a proliferar en la cebada utilizada para la producción de cerveza durante su almacenamiento cuando las condiciones de temperatura y humedad son las adecuadas (Anli & Alkis, 2010). Sólo entre el 2 y el 13% de la OTA presente en la cebada se elimina durante el proceso de fabricación de la cerveza (Scudamore, 2004), por lo que la detección de hongos ocratoxígenos en la materia prima puede ser un buen indicador de la posible presencia de la toxina en el producto final.

En este trabajo, se han analizado 30 muestras de harina de cebada recogidas en fábricas de cerveza distribuidas en seis Comunidades Autónomas. Los resultados indican un alto porcentaje de contaminación por dos de las principales especies ocratoxígenas de *Aspergillus* sección Circumdati, *A. ochraceus* y *A. steynii* (53% de las muestras). La presencia de *A. steynii* en el 68% de las muestras contaminadas pone en evidencia una más que probable contaminación por OTA tanto en dicha matriz alimentaria como en la cerveza procesada debido a la altísima capacidad de



producción de prácticamente todas las cepas de esta especie que se ha demostrado en esta tesis.

La distribución de estas especies a lo largo de la geografía española es desigual. La gran incidencia de *Aspergillus* de la sección *Circumdati* en muestras procedentes de Castilla la Mancha, así como su falta de presencia en las de Castilla y León, lleva a pensar que estas especies se podrían ver desfavorecidas por las temperaturas más bajas que, según la agencia estatal de meteorología (AEMET) ([www.aemet.es](http://www.aemet.es)) se dan en esta región peninsular. Además hay que comentar que las precipitaciones son más escasas en Castilla la Mancha por lo que parece que estas especies podrían resistir considerablemente bien la sequía de estas zonas. Los resultados obtenidos en las muestras procedentes de otras Comunidades Autónomas no son concluyentes debido a su bajo número y habría que llevar a cabo más estudios en estas regiones. Desde la descripción de las nuevas especies de la sección *Circumdati* (Frisvad *et al.*, 2004), se han publicado muy pocos trabajos donde se estudie su distribución por lo que los resultados obtenidos no se pueden comparar con los de otros autores. Sería muy interesante realizar un estudio de incidencia de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* en climas más fríos como podría ser el norte de Europa donde típicamente se habían descrito especies del género *Penicillium* como las principales productoras de OTA (Barlow *et al.*, 2008).

## 2.2.- DETECCIÓN DE *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* Y *A. steynii* EN PIMENTÓN

Cada vez existen más trabajos que demuestran la presencia de OTA en distintas especies por lo que, recientemente, la Unión Europea ha legislado los niveles máximos de esta micotoxina que se puede encontrar en una gran variedad de estos productos (Comisión Europea, 2010a). El pimentón es un condimento en polvo de color rojo obtenido a partir del secado y molido de algunos tipos de pimiento y es usado muy habitualmente para preparar platos tradicionales en muchos países. La contaminación por OTA en esta especie se ha visto con anterioridad en varias ocasiones (Almela *et al.*, 2007; Shundo *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010b).

En este trabajo, la presencia de las especies de *Aspergillus* sección *Circumdati* estudiadas, se ha encontrado en el 19% de las muestras analizadas y tanto *A. ochraceus* como *A. westerdijkiae* y *A. steynii* se han detectado en más de una ocasión. Santos *et al.* (2008) revisaron el tema de la incidencia de micotoxinas y hongos toxígenos en distintos tipos de pimentón y encontraron que la contaminación de este producto dependía, en gran medida, de su procedencia. Igualmente, Almela *et al.* (2007) relacionaron la contaminación por hongos

productores de micotoxinas con el origen geográfico de los pimientos con los que fue elaborado el pimentón. Ésta podría ser la razón de la altísima incidencia de hongos productores de OTA presentes en estas muestras ya que las condiciones climáticas y/o las malas prácticas agrícolas llevadas a cabo pueden suponer el aumento de la colonización fúngica. En ese último trabajo, Almela *et al.* (2007), señalan una importante incidencia de *Aspergillus* de la sección Circumdati en muestras de pimentón dulce. La clasificación de los aislamientos que realizaron utilizando claves de identificación publicadas hace mucho tiempo, les llevaron a identificar estos hongos como *A. ochraceus*. Sin embargo, teniendo en cuenta la alta capacidad de producción de los aislamientos que obtuvieron, se podría suponer que realmente algunos de ellos se corresponderían con cepas de *A. westerdijkiae* y/o *A. steynii*.

Al estudiar por separado los resultados de las muestras contaminadas en cada uno de los tipos de pimentón analizado, se observó un aumento de la incidencia de las especies de estudio en el pimentón dulce y que en el pimentón picante era donde menos se detectaban. El pimentón picante presenta capsaicina, una sustancia que no está presente en el pimentón dulce, y que se ha visto tiene efecto antimicrobiano frente a distintos tipos de microorganismos (Kraikruan *et al.*, 2008; Tewksbury *et al.*, 2008). La capsaicina podría afectar al crecimiento de estas especies, lo que podría ser la razón por la cual no se detecta ninguna de ellas en las muestras de pimentón picante. Santos *et al.* (2010b) encontraron una disminución de OTA en pimentón picante al compararlo con el dulce por lo que postulan que la capsaicina podría afectar a la producción en especies ocratoxígenas. Sin embargo, en el futuro habrá que llevar a cabo estudios de los efectos que pueda tener esta sustancia sobre el crecimiento y la producción de OTA en *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y *A. ochraceus* para poder confirmar estas hipótesis.

\*\*\*\*\*

Desde la descripción de *A. westerdijkiae*, algunos autores han sugerido que todos los aislamientos de *A. ochraceus* encontrados en trabajos previos deberían ser reclasificados e incluidos dentro de la nueva especie, afirmando que *A. westerdijkiae* parece ser el productor de OTA de la sección Circumdati más frecuente en matrices alimentarias (Marino *et al.*, 2009). Sin embargo, la aplicación de los protocolos de PCR descritos en este trabajo para la detección de *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* y *A. steynii* en pimentón y harina de cebada, no concuerdan con estas hipótesis. No

sólo se sigue detectando *A. ochraceus* en las dos matrices alimentarias analizadas, sino que es incluso más frecuente que *A. westerdijkiae*.

Hasta el momento, la presencia de *A. steynii* sólo se había descrito en café (Leong *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2009), probablemente debido a su reciente descripción. Por tanto, esta es la primera vez que se demuestra la incidencia de esta especie en matrices diferentes como son el pimentón y la harina de cebada. Además, no existía ninguna cita bibliográfica hasta el momento que describiera la presencia de *A. westerdijkiae* en pimentón.

### **3. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN CIRCUMDATI**

Frisvad *et al.* (2004) publicaron una revisión de las especies de *Aspergillus* sección Circumdati realizando un análisis de las secuencias del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina. En este trabajo, describieron nuevas especies y señalaron que algunas podrían ser importantes productoras de OTA. Otros estudios posteriores destacaron tanto a *A. ochraceus* como a *A. westerdijkiae* y *A. steynii* como las principales especies ocratoxígenas de la sección Circumdati pero en ninguno de ellos se precisa cual es la capacidad de producción de estas especies y cuál sería su contribución a la contaminación total de OTA en los productos alimentarios.

Los altísimos niveles de producción de OTA alcanzados por prácticamente todos los aislamientos de *A. steynii* en el comúnmente usado medio CYA destacan la relevancia de esta especie por encima de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus*. Las cepas de *A. steynii* analizadas en este estudio procedían de orígenes muy distintos y en todos los casos la producción de OTA fue muy alta, por lo que se puede deducir que su presencia en cualquier matriz alimentaria supondría un importante riesgo de contaminación por OTA.

*A. ochraceus* ha sido considerada durante mucho tiempo una de las más importantes especies productoras de OTA en gran variedad de sustratos (Taniwaki *et al.*, 2003; Bellí *et al.*, 2004; Urbano *et al.*, 2004). Sin embargo, su importancia relativa disminuyó después de la descripción de *A. westerdijkiae* como una nueva especie debido a que la detección de esta última era más frecuente (Leong *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2009). Los altos niveles de producción de las cepas y el elevado porcentaje de cepas productoras (66,7%) hacen que la presencia de *A. westerdijkiae* en matrices alimentarias tenga que ser considerada como un certero indicador de la potencial contaminación por OTA.

Distintos autores han señalado la enorme variabilidad intraespecífica que existía en la capacidad de producir OTA de los distintos aislamientos de *A. ochraceus* (Pardo *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2006b). Viendo los resultados de este estudio, estas grandes variaciones se podrían atribuir a una incorrecta clasificación de los aislamientos pudiendo ser los más productores cepas de *A. steynii* o *A. westerdijkiae* mientras que los aislamientos con menor capacidad de producción podrían corresponderse con la especie *A. ochraceus*.

Durante mucho tiempo la producción de OTA por *A. elegans* ha sido un tema bastante controvertido. Algunos autores han señalado la capacidad ocratoxígena de esta especie (Batista *et al.*, 2003; Palumbo *et al.*, 2007), mientras que otros sugieren que la descripción previa de cepas productoras de *A. elegans* se debió a que no estaban bien identificadas (Samson *et al.*, 2006). Sin embargo, en este caso, la habilidad de los aislamientos de esta especie para producir OTA ha sido demostrada y la identificación de los aislamientos fue confirmada mediante secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 y del gen *βtub*. Los niveles de producción alcanzados por *A. elegans* no fueron muy elevados, pero el alto porcentaje de cepas productoras hace que la presencia de esta especie en los alimentos deba ser tomada en cuenta para evitar la contaminación por OTA de los mismos.

Con todos estos datos, se puede concluir que la presencia en un alimento de *A. westerdijkiae* y, particularmente, de *A. steynii* supone un gran riesgo de contaminación por OTA debido a su alta capacidad de producción. También es importante tener en cuenta la diversidad de alimentos que pueden contaminar. Aunque los niveles de producción de OTA son menores en *A. elegans* y *A. ochraceus*, algunos de sus aislamientos también son capaces de formar la toxina, por lo que el riesgo supuesto por ellas tampoco debe ser ignorado.

#### **4. EFECTO DE FACTORES ECOFISIOLÓGICOS SOBRE EL CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y LA ESPORULACIÓN EN *A. westerdijkiae* Y *A. steynii***

D'Mello & MacDonald (1997) señalaron que los factores más importantes que pueden afectar al crecimiento de los hongos y a su capacidad productora de micotoxinas eran los físicos y, destacaron la temperatura y la  $a_w$  como los más significativos. En este estudio, se ha analizado el efecto de estos factores sobre el crecimiento y la producción de OTA en *A. westerdijkiae* y *A. steynii*. Además, se ha estudiado la posible incidencia de la temperatura y la  $a_w$  sobre la esporulación ya

que parece ser que este parámetro está ligado a las rutas biosintéticas de producción de micotoxinas (Brodhagen & Keller, 2006).

Algunos estudios sobre el efecto de factores ecofisiológicos previos a la descripción de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* como nuevas especies utilizaron aislamientos de *A. ochraceus* que, en esta tesis, se han reclasificado tras analizar sus secuencias del gen *βtub* y de la región ITS1-5,8S-ITS2. A lo largo de este apartado de la sección Discusión, se van a tomar los resultados de estas publicaciones con respecto a la clasificación actual de esas cepas. Cabe destacar que hay una gran cantidad de trabajos realizados con la cepa NRRL 3174 (=CECT 2948) considerada antiguamente la especie tipo de *A. ochraceus* y que, tras el trabajo de Frisvad *et al.* (2004), fue reclasificada y pasó a ser la especie tipo de *A. westerdijkiae*.

#### 4.1.- ESTUDIO DEL EFECTO DE FACTORES ECOFISIOLÓGICOS EN MEDIO SINTÉTICO

Debido a la reciente descripción de *A. westerdijkiae* y *A. steynii*, únicamente existe hasta el momento un trabajo en el cual se estudia el efecto de factores ecofisiológicos en estas especies (Abdel-Hadi & Magan, 2009). Estos autores comprobaron que a 30 °C, mientras que la  $a_w$  óptima para el crecimiento de *A. westerdijkiae* era 0,95, *A. steynii* crecía mejor con  $a_w$  más alta (0,99) utilizando un medio sintético. Esto implicaría que *A. westerdijkiae* sería capaz de proliferar mejor en sustratos con una baja disponibilidad de agua, pudiendo desplazar a *A. steynii* en estas condiciones favorables. Los resultados obtenidos en el trabajo realizado en esta tesis en medio sintético difieren ligeramente de los observados por Abdel-Hadi & Magan (2009). En el trabajo citado, los autores señalan un diferente comportamiento de las especies dependiendo de las condiciones de  $a_w$  y temperatura utilizadas, siendo en algunas ocasiones superior el crecimiento en *A. steynii* y otras en *A. westerdijkiae*. Sin embargo, en nuestro caso, aún no encontrando diferencias estadísticamente significativas, parece que hay una tendencia a que el crecimiento de *A. westerdijkiae* en medio CYA sea superior en todas las condiciones. La  $a_w$  óptima de crecimiento obtenido en ambas especies es similar que el descrito por Abdel-Hadi & Magan (2009) aunque encontramos diferencias en la temperatura óptima debido a que los rangos probados en este trabajo y en esta tesis no eran los mismos.

La producción de OTA por *A. steynii* en todas las condiciones probadas fue superior a la de *A. westerdijkiae* excepto a las condiciones en el límite inferior de  $a_w$  y temperatura ( $a_w=0,928$  y 20 °C) donde la primera fue incapaz de producir OTA.

Esta sería otra evidencia de que *A. westerdijkiae* podría estar adaptado a condiciones más frías y con baja disponibilidad de agua que *A. steynii*. Los resultados obtenidos sobre la producción de OTA en esta última especie muestran una clara tendencia al aumento de la concentración de toxina en el medio a mayor temperatura y  $a_w$ , lo que nos indicaría que esta especie está más adaptada a climas cálidos y con elevada humedad. Estos resultados vuelven a diferir de los encontrados en el trabajo de Abdel-Hadi & Magan (2009) donde vieron una elevadísima producción de OTA en *A. steynii* a  $a_w$  muy baja.

Pardo *et al.* (2005) señalaron que el sustrato es un factor muy importante para el crecimiento fúngico y la capacidad de las especies para producir OTA. Estos autores observaron grandes variaciones cuando se modificaba el medio de cultivo. Ésta podría ser la explicación de las diferencias observadas entre el estudio llevado a cabo en esta tesis, en medio CYA, y el realizado por Abdel-Hadi & Magan (2009) donde se utilizó medio YES.

#### 4.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE FACTORES ECOFISIOLÓGICOS EN MEDIOS BASADOS EN MATRICES ALIMENTARIAS

Tras comprobar el comportamiento de las dos especies en un medio sintético variando la  $a_w$  y la temperatura de incubación para obtener un perfil estándar de su capacidad de crecimiento y producción de OTA, se analizó el efecto de esos mismos parámetros en medios de cultivo basados en matrices alimentarias. Los sustratos utilizados para la realización de los medios de cultivo fueron seleccionados debido a que en ellos había sido descrita previamente la presencia *A. westerdijkiae* y/o *A. steynii* por otros autores o se había detectado o aislado alguna de estas especies en esa matriz alimentaria en trabajos llevados a cabo en nuestro grupo.

Los resultados obtenidos en los medios preparados a partir de las infusiones de los productos alimentarios elegidos pueden considerarse una muy buena aproximación a la manera en que se comportarían los hongos creciendo realmente en los sustratos naturales (Pardo *et al.*, 2005). Ramos *et al.* (1998) encontraron unos patrones muy similares entre el comportamiento de especies ocratóxigenas en medios preparados a partir de infusiones de cebada y directamente en granos de cereal.

En numerosos trabajos en los que se estudia el efecto de factores ecofisiológicos sobre distintos parámetros en *A. ochraceus*, los autores destacan la altísima variabilidad de los resultados que se obtienen entre los aislamientos analizados (Pardo *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2006b). En este estudio, no se ha

encontrado variabilidad intraespecífica entre los resultados obtenidos entre las dos cepas de *A. westerdijkiae* y las dos de *A. steynii*, aunque sí una importante variabilidad interespecífica tanto en el crecimiento como en la capacidad de producción de OTA de las mismas. Esto podría ser explicado suponiendo que los aislamientos de *A. ochraceus* que utilizaron estos autores no se correspondían realmente a esa especie sino que deberían ser reclasificados e incluirse en alguna de las otras dos.

Los diferentes sustratos utilizados no ejercieron efecto sobre el crecimiento de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* tras 10 días de incubación en ningún caso, obteniendo un perfil semejante en todos ellos. Además, los niveles de crecimiento alcanzados por ambas especies fueron similares a los obtenidos en medio CYA. El efecto de la temperatura y la  $a_w$  también fue similar al encontrado en el medio sintético, viéndose el crecimiento reducido de manera significativa a la temperatura más baja, 20 °C, y a  $a_w=0,928$ . Hay que destacar que en todos los medios y condiciones estudiadas, *A. westerdijkiae* fue capaz de crecer significativamente más que *A. steynii*.

Por el contrario, el medio ejerció un papel fundamental en la producción de OTA por ambas especies. Hablando de manera general, el medio preparado a partir de pimentón fue donde ambas especies produjeron más OTA, seguido, en este orden, por los medios de cebada, maíz, café y anís. *A. steynii* fue capaz de producir unos niveles muy reducidos de toxina en medio preparado a partir de uvas y ninguna de las cepas de *A. westerdijkiae* fue capaz de formar la toxina en estas placas. Estos resultados coinciden con lo que ya describieran Lai *et al.* (1970) que vieron que la composición del medio no afecta de manera significativa al crecimiento del hongo, aunque sí que es muy importante para su capacidad de producir OTA. Otros autores han señalado en sus trabajos que la producción de OTA y el crecimiento no se encuentran directamente correlacionadas y que la formación de la toxina no ocurre siempre que el hongo es capaz de crecer (Mühlencoert *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2006a). La gran diferencia encontrada en la producción de ambas especies con respecto a la matriz alimentaria sobre la que estuvieran creciendo se debe, fundamentalmente, a la composición de la misma. Se ha demostrado que la fuente de carbono predominante en el medio es decisiva para la capacidad de producción de hongos ocratoxígenos (Mühlencoert *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2008). Tanto *A. westerdijkiae* como *A. steynii* pueden producir mayores cantidades de toxina cuando la fuente de carbono en el medio es sacarosa; sin embargo esta capacidad se ve considerablemente reducida cuando el azúcar presente es fructosa (Mühlencoert *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2008). Tras el agua, los componentes más abundantes de

las uvas son los azúcares, en su mayor parte fructosa (Dharmadhikari, 1994). Esta sería la causa por la que los dos hongos de estudio crecen bien en el medio formado a partir de esta matriz alimentaria pero ven significativamente reducida su capacidad para producir la toxina. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Pardo *et al.*, 2006b; Kapetanakou *et al.*, 2009) que observaron una producción muy reducida sobre uvas o derivados si se comparaba con la producción de los aislamientos en otros medios.

Distintos autores habían comprobado la capacidad para producir OTA de especies de la sección *Circumdati* en cereales, pero, como se ha comentado anteriormente, no se sabe con exactitud a qué especie pueden pertenecer esos aislamientos (Ramos *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2006b). La alta capacidad para producir OTA de los aislamientos analizados en los medios basados en cereales también se puede explicar por la fuente de carbono mayoritaria en ellos. En varios trabajos, se ha visto que distintos hongos toxígenos son capaces de utilizar el almidón para crecer y que, además, un medio que sólo contenga este polisacárido como fuente de carbono es adecuado para la producción de micotoxinas (Bluhm & Woloshuk, 2005; Roussos *et al.*, 2006). Habría que llevar a cabo más estudios para comprobar si estos resultados previos que otros autores han observado en hongos aflatoxígenos y productores de fumonisinas también sería aplicable a las especies productoras de OTA y, particularmente, a *A. westerdijkiae* y *A. steynii*.

Ya se ha mencionado en varias ocasiones que *A. ochraceus* fue considerado durante mucho tiempo la principal fuente de OTA en café (Urbano *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003). Por ello, distintos trabajos han estudiado la producción de toxina en esta matriz de especies de la sección *Circumdati* (Mantle & Chow, 2000; Pardo *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2006b). Los resultados obtenidos en el ensayo realizado con *A. westerdijkiae* y *A. steynii* coinciden con los descritos por estos autores que establecieron un máximo de producción de OTA a una temperatura entre 25-30 °C y una  $a_w$  entre 0,95-0,99. Sin embargo, los niveles de producción de todos los aislamientos ensayados de las dos especies tuvieron una menor capacidad de producción de OTA en este medio preparado a partir de café que en otros como el basado en pimentón o en cebada, aún cuando el crecimiento fue similar en todos ellos. En varios trabajos se ha comprobado que uno de los componentes del café, la cafeína, puede reducir e incluso inhibir la producción de OTA en hongos ocratoxígenos de la sección *Circumdati* (Buchanan *et al.*, 1982; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004). Por tanto, la reducción en la producción de OTA en *A. westerdijkiae* y *A. steynii* en medio de café podría ser debida a la presencia de este compuesto.



Según los resultados obtenidos, la presencia de *A. steynii* en café y maíz, supondría un mayor peligro de contaminación por OTA del alimento que si el hongo detectado fuera *A. westerdijkiae*.

Los hongos, al igual que el resto de microorganismos, pueden ejercer distintas estrategias para evitar el crecimiento de sus competidores a la hora de colonizar y mantenerse en un determinado nicho ecológico (Magan & Aldred, 2007). En el caso de las dos especies estudiadas, parece que nos encontramos ante dos estrategias diferentes. *A. westerdijkiae* es capaz de crecer muy rápidamente de manera que impediría la colonización de sus competidores en el mismo sustrato. Sin embargo, *A. steynii* produce gran cantidad de OTA lo que le podría aportar una ventaja competitiva frente a otros hongos que compartieran su sustrato. Este hecho se ha comprobado previamente en el caso de otras micotoxinas como las fumonisinas ya que pueden inhibir el crecimiento de otros hongos no productores de la toxina (Magan & Aldred, 2007). Esta hipótesis tendrá que ser comprobada viendo si el comportamiento de *A. westerdijkiae* y *A. steynii*, en cuanto a su capacidad de crecimiento y producción de OTA, es la misma en co-cultivos de ambas especies o con otras que habitualmente contaminan sus mismos sustratos.

El efecto de los factores estudiados sobre la producción de OTA de estas especies fue mucho más fácilmente observable en el caso de *A. steynii*. Como ocurría en el medio sintético CYA la producción de toxina en esta especie se redujo a 20 °C y a la menor  $a_w$  (0,928). Esto nos indica que la estimación de los efectos de los factores ecofisiológicos en medios artificiales puede dar una gran idea para la planificación de estudios posteriores directamente sobre matrices alimentarias. En el caso de *A. westerdijkiae*, la temperatura y la  $a_w$  no afectaron a la producción de OTA y no pareció haber un patrón específico en ningún caso. Sin embargo, el sustrato sí fue un factor determinante ya que se pudo observar una altísima producción en los medios de pimentón y cebada, principalmente a  $a_w$  elevada. Además, hay que destacar que tanto en esta especie como en *A. steynii*, en prácticamente todos los medios, se obtuvo un máximo de producción a 28 °C y  $a_w=0,995$ . Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan las afirmaciones realizadas por gran variedad de autores que defienden que si los productos alimentarios se conservaran en unas condiciones de temperatura y humedad adecuadas, se reduciría considerablemente la contaminación por OTA en los mismos (Kabak *et al.*, 2006; Amézqueta *et al.*, 2009).

Como se ha comentado, la detección de alguna de estas dos especies en algún alimento mediante los ensayos de PCR diseñados supondría un gran riesgo de

contaminación por OTA debido a la alta capacidad toxígena tanto de *A. steynii* como de *A. westerdijkiae*. Los resultados obtenidos sobre la capacidad de crecer y producir OTA en los distintos medios basados en distintas matrices, complementan el resto de estudios llevados a cabo durante la realización de esta tesis. La capacidad para producir OTA de los aislamientos depende, en gran medida, del sustrato en el que se desarrollen y dependiendo de esto, la detección de estos hongos en ellas deberá ser más o menos tenida en cuenta. Por ejemplo, la presencia de cualquiera de las dos especies en muestras de cebada o pimentón, supondría un alto riesgo de presencia de OTA ya que tanto *A. westerdijkiae* como *A. steynii* pueden producir elevados niveles de toxina. La detección de *A. steynii* en café y anís también habría que tenerla muy en cuenta para poder predecir la posible contaminación con la toxina, mientras que su presencia en uvas no supondría un riesgo importante aunque tampoco podría ser ignorado.

Brodhagen & Keller (2006) señalaron que la esporulación y la producción de micotoxinas podrían estar relacionadas ya que sus rutas de síntesis se encontraban reguladas de manera similar. El efecto de la temperatura y la  $a_w$  sobre la esporulación en distintas especies de *Aspergillus* sección Circumdati ha sido estudiado recientemente (Abdel-Hadi & Magan, 2009). Estos autores observaron como la tasa de esporulación tanto en *A. westerdijkiae* como en *A. steynii* se incrementaba cuando se sometía a las especies a condiciones de estrés hídrico. En nuestro caso no se han encontrado diferencias en la esporulación en ninguna de las especies cuando se variaban la temperatura y/o la  $a_w$ . Además, los resultados obtenidos en esta tesis no concuerdan con lo afirmado por Brodhagen & Keller (2006) ya que aunque *A. steynii* es capaz de producir altísimos niveles de OTA, su capacidad para producir esporas no es mayor que la de la otra especie. Por tanto, se deduce que lo descrito por estos autores no se puede generalizar a todas las especies productoras de micotoxinas y habría que estudiar cada caso de forma independiente.

Los resultados presentados en este trabajo aportan datos de gran interés sobre la capacidad ocratoxígena de las especies de la sección Circumdati. Debido a los cambios en la clasificación de este grupo del género *Aspergillus*, actualmente, es muy difícil llegar a saber si los resultados presentados por todos los autores hasta la descripción de *A. westerdijkiae* y *A. steynii* como nuevas especies se corresponden realmente con aislamientos de *A. ochraceus* o de cualquier otra de estas.

## 5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. westerdijkiae*

O'Callaghan *et al.* (2003) fueron los primeros que caracterizaron un gen *pks* en *A. ochraceus* que codificaba para una enzima de la familia de las poliquétido sintasas (PKS) que estaba implicado en la ruta de síntesis de OTA ya que los mutantes que tenían este gen interrumpido eran incapaces de producir la toxina. En este trabajo, además, caracterizaron una gran cantidad de genes cuyos niveles de expresión aumentaban en condiciones adecuadas para la producción de OTA en esta especie. Posteriormente, estos mismos autores (O'Callaghan *et al.*, 2006) analizaron la expresión de alguno de estos genes y comprobaron que uno de ellos, *p450-B03*, que codificaba para una citocromo p450 monooxigenasa se correlacionaba positivamente tanto con los niveles de toxina en el medio como con los de expresión del gen *pks* descrito anteriormente. Estos trabajos fueron pioneros en la caracterización de genes implicados en la ruta de síntesis de OTA y su realización fue previa a la descripción de *A. westerdijkiae* como una nueva especie (Frisvad *et al.*, 2004). Como ya se ha visto en esta tesis, los niveles de producción de *A. ochraceus* son considerablemente menores que los de *A. westerdijkiae* por lo que es de suponer que los autores utilizasen un aislamiento de ésta última para llevar a cabo sus estudios. En este trabajo, se han diseñado cebadores específicos basados en las secuencias de estos dos genes y, mediante ensayos de PCR convencional, se ha comprobado que realmente la banda específica de amplificación se obtenía con DNA de *A. westerdijkiae* y no de *A. ochraceus*. Por tanto, el aislamiento utilizado por el grupo de O'Callaghan para la caracterización de los genes *pks* y *p450-B03* debe ser reclasificado y considerarse una cepa de *A. westerdijkiae*. En esta tesis, los niveles de transcripción de estos genes se analizaron mediante PCR a tiempo real para la obtención de una curva de expresión de los mismos a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por O'Callaghan *et al.* (2006) donde existe una relación entre los niveles de expresión de los genes *pks* y *p450-B03* y la concentración de toxina detectada en el medio. No se obtuvieron niveles de expresión detectables en ninguno de los casos en la cepa no productora, 3.38.

González-Salgado (2009), utilizando la técnica de paseo cromosómico, comprobó que estos dos genes, *pks* y *p450-B03*, se encontraban en la misma región del genoma y que estaban separados por otro gen, *nrps*, que codificaba para una sintetasa de péptidos no ribosomales. En la sección Introducción se ha comentado que en la ruta de síntesis de OTA debería actuar una enzima de este tipo para la unión de la molécula de OT- $\alpha$  a la fenilalanina. Este hallazgo fue una evidencia de

que en *A. westerdijkiae* los genes de producción de OTA también se encontraban en un *cluster* como ya se había visto en *P. nordicum* (Karolewicz & Geisen, 2005; Geisen *et al.*, 2006). A pesar de la caracterización del gen, nunca antes se había analizado su transcripción en cepas productoras y no productoras de OTA. El análisis mediante PCR a tiempo real realizado en esta tesis reveló que los niveles de expresión del gen *nrps*, también estaban relacionados con la producción de toxina y que únicamente las cepas productoras, CECT 2948 y 3.58, lo expresaban en niveles detectables. Además, hay que destacar que el perfil de expresión del gen *nrps* a lo largo del tiempo era muy similar al obtenido para los genes *pks* y *p450-B03* lo que refuerza la hipótesis de que estos tres genes agrupados se transcriben conjuntamente y se encuentran corregulados como ya se ha descrito en especies que producen otras micotoxinas como fumonisinas o aflatoxinas (Yu *et al.*, 2004; Desjardins & Proctor, 2007).

Por otro lado, Bacha *et al.* (2009) caracterizaron un gen en *A. westerdijkiae*, *aoks1*, que codificaba para una PKS diferente del descrito por O'Callaghan *et al.* (2003) y comprobaron que los mutantes en ese gen no podían producir la toxina. En este trabajo, se ha analizado la expresión del gen *aoks1* mediante PCR a tiempo real y se ha comprobado que su transcripción no se relaciona con la producción de toxina en las condiciones probadas. Los mayores niveles de expresión del gen *aoks1* se obtuvieron en la cepa de *A. westerdijkiae* no productora de OTA. Las enzimas de la familia de las poliquétido sintasas están implicadas en la síntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios en el género *Aspergillus* (Chiang *et al.*, 2010). Los autores del trabajo donde se describe el gen *aoks1* no analizan su expresión en una cepa no productora de OTA, por lo que no dilucidan si el gen descrito podría estar implicado en rutas de síntesis de otras moléculas. Además, cabe destacar que una de las dos cepas productoras de OTA, 3.58, no expresa el gen a ninguno de los tiempos de incubación estudiados, lo que sigue apoyando la hipótesis de la dudable implicación de este gen en la síntesis de OTA en estas condiciones. Por otro lado, se ha visto en varias ocasiones que en la biosíntesis de una micotoxina pueden intervenir distintas enzimas PKS cuyos genes se expresan de manera variable dependiendo de las condiciones utilizadas (Huffman *et al.*, 2010). El medio de cultivo utilizado por Bacha *et al.* (2009) para el estudio de la producción de OTA y expresión del gen *aoks1* en la cepa de *A. westerdijkiae* elegida, es muy complejo lo que podría favorecer la expresión de este gen en esas condiciones. Sin embargo, habría que llevar a cabo estudios en ese medio del gen *pks* descrito por O'Callaghan *et al.* (2003) para comprobar si su expresión es excluyente de la del gen *aoks1* o si ambos se pueden co-expresar en la producción de OTA en esas condiciones.

Por tanto, según los resultados obtenidos en este estudio, se refuerza la hipótesis de que los genes de producción en *A. westerdijkiae* se encuentran agrupados y que se co-expresan en condiciones adecuadas para la producción de OTA. No se han encontrado evidencias de que el gen *aoks1* descrito por Bacha *et al.* (2009) intervenga en la ruta de síntesis de la toxina, al menos en las condiciones planteadas en este ensayo.

## **6. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RUTA DE SÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. steynii***

La ruta de síntesis de OTA en *A. steynii* no había sido estudiada hasta el momento. Sin embargo, la enorme capacidad para producir la toxina de este hongo que se ha demostrado en este trabajo, supone la necesidad del conocimiento de los genes implicados en su biosíntesis para conocer su regulación y de esta manera poder desarrollar métodos de control de la producción de OTA en *A. steynii*.

En diferentes ocasiones, se ha demostrado la implicación de proteínas de la superfamilia citocromo P450 en la ruta biosintética de diferentes micotoxinas como las aflatoxinas (Yu *et al.*, 2004), los tricotecenos y las fumonisinas (Desjardins & Proctor, 2007), y se han propuesto como posibles implicadas en la síntesis de OTA en *A. westerdijkiae* y *A. niger* (O'Callaghan *et al.*, 2006; González-Salgado, 2009).

En esta tesis, a partir de una pequeña secuencia de 75 pb con una alta identidad con el gen *p450-B03* de *A. westerdijkiae* se obtuvo la secuencia completa del gen *p450ste* de *A. steynii* utilizando la técnica 5'-RACE. Desde su descripción (Frohman *et al.*, 1989), este método ha sido utilizado frecuentemente para la obtención de distintas secuencias de genes fúngicos aunque únicamente hemos encontrado su aplicación en una ocasión para el estudio de genes implicados en la síntesis de micotoxinas (Young *et al.*, 2001). Con esta técnica se obtuvo una secuencia de 1436 pb con una identidad del 80% con el gen *p450-B03* de *A. westerdijkiae* y de un 66% con el gen que probablemente codifica para una citocromo p450 implicada en la síntesis de OTA en *A. niger*. En cuanto a la secuencia de aminoácidos de la proteína P450STE, nos encontramos con una similitud del 86,2% con la citocromo p450 de *A. westerdijkiae*, P450-B03 y un 67,4% con la de *A. niger*. En varias ocasiones se ha postulado la baja identidad que existe entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas de la superfamilia de las citocromo p450 que en muchos de los casos se sitúa por debajo del 20% (Werck-Reichardt & Feyereisen, 2000). Esto se debe a que la estructura secundaria de la

proteína se conserva fácilmente y, por tanto, su función, aunque la secuencia primaria de aminoácidos tenga una identidad muy baja (Cresnar & Petric, 2011). Sin embargo, la secuencia aminoacídica de la proteína STEP450 tiene una identidad muy elevada con las otras dos mencionadas lo que podría ser debido a que realmente en los tres casos comparten la misma función en la ruta de síntesis de OTA en las tres especies, *A. steynii*, *A. westerdijkiae* y *A. niger*. Esta afirmación se ve apoyada por el hecho de que si comparamos la secuencia de estas tres proteínas con otras relacionadas con la síntesis de micotoxinas distintas a la OTA como CYP4 o TRI4, implicadas en la síntesis de aflatoxinas y tricotecenos, respectivamente, obtenemos valores de identidad de aproximadamente el 30%.

Hasta el momento, todas las proteínas de la superfamilia de las citocromo p450 que se han visto formando parte de las agrupaciones de genes implicadas en la síntesis de micotoxinas se han incluido dentro de las enzimas P450 de tipo II (Cresnar & Petric, 2011). Esto haría pensar que la proteína descrita en este trabajo también se englobaría dentro del tipo II y se puede confirmar por la presencia en ella del motivo de unión a membrana característico de este grupo ya que son enzimas que se encuentran unidas por la cara externa de la membrana del retículo endoplasmático (Werck-Reichardt & Feyereisen, 2000).

Aparte del gen *p450ste*, se caracterizaron otros genes cuyas altas identidades en la secuencia con otros implicados en la síntesis de OTA en otras especies, llevó a pensar que también podrían intervenir en la producción de toxina en *A. steynii*. Por un lado, se caracterizó un fragmento de 500 pb con una identidad de más de un 75% con el gen *otach1* implicado en la síntesis de OTA en *P. nordicum* (Karolewicz & Geisen, 2005). Sin embargo, los estudios de PCR a tiempo real llevados a cabo, mostraron que no había una expresión más elevada de este gen el caso de las cepas productoras con respecto a la no productora. Actualmente, se sabe que una gran variedad de hongos son capaces de producir este tipo de enzimas de la familia de las cloroperoxidasas con distintos fines (Ortiz-Bermúdez *et al.*, 2003). Lo más probable es que la secuencia génica caracterizada sí que codifique para una proteína incluida en esta familia pero no esté relacionada con la síntesis de OTA.

Por otro lado, se obtuvo la secuencia de dos genes que tenían una elevada identidad con los genes *pks* y *aoks1* en *A. westerdijkiae* que codifican para proteínas del tipo PKS y que habían sido descritas, en este momento, como implicadas en la síntesis de OTA (O'Callaghan *et al.*, 2006; Bacha *et al.*, 2009). Sin embargo, al intentar diseñar cebadores para el estudio de su expresión mediante PCR a tiempo real, apareció el problema de que ninguna de las parejas probadas amplificaba una

región pequeña adecuada para el método elegido. El análisis de la estructura secundaria de las secuencias a la temperatura de hibridación de los cebadores no reveló que se estuvieran produciendo bucles u otro tipo de estructuras que impidieran la unión de los mismos, por lo que se descarta esta idea como un posible motivo para la no amplificación. Asimismo, tampoco se encontró un resultado positivo mediante PCR convencional al utilizar cDNA de *A. steynii* y los cebadores PKS4-KOF/PKS4-FOR, con los que sí se obtenía amplificación al utilizar DNA de esta especie. Por tanto, habrá que llevar a cabo más estudios para dilucidar que mecanismo podría estar implicado en este hecho y se barajarán distintos métodos de silenciamiento génico.

## **7. ESTUDIO DE *D. hansenii* CYC 1244 PARA SU APLICACIÓN COMO AGENTE DE BIOCONTROL FRENTE A *A. westerdijkiae***

Desde hace mucho tiempo, las levaduras han sido consideradas como uno de los más adecuados agentes de biocontrol debido a varias de sus características como que pueden crecer en fermentadores y proliferar rápidamente, que tienen pocos requerimientos nutricionales o su falta de producción de metabolitos tóxicos para los seres humanos (Wilson & Wisniewski, 1989). Actualmente, se conocen distintos géneros de levaduras capaces de inhibir el crecimiento de hongos ocratoxígenos (Zahavi *et al.*, 2000; Blevé *et al.*, 2006; Dimakopoulou *et al.*, 2008) y, específicamente, algunas cepas de *Pichia* y *Hanseniaspora* son consideradas posibles agentes de biocontrol frente a *A. ochraceus* (Masoud & Kaltoft, 2006). En este trabajo, se realizó un análisis inicial en placa para comprobar si 16 cepas de distintas levaduras inocuas y aisladas de alimentos podían afectar al crecimiento de *A. westerdijkiae*. Dos cepas de *D. hansenii* (CYC 1021 y CYC 1244) mostraron actividad antagonista frente a las distintas cepas del hongo, aunque en un estudio más en profundidad se descartó a *D. hansenii* CYC 1021 como candidato debido a que su presencia suponía una menor reducción en el crecimiento de *A. westerdijkiae* y, además, un aumento en su capacidad de producir OTA. A la hora de seleccionar un agente de biocontrol frente a hongos toxígenos es imprescindible llevar a cabo estudios preliminares de los efectos que pueden tener sobre el crecimiento y la producción de toxina de los mismos. Se ha visto que la presencia de determinados competidores puede suponer un aumento de la formación de metabolitos secundarios en algunas especies de *Aspergillus* (Losada *et al.*, 2009), lo que podría explicar el aumento de la concentración de OTA detectada en el medio en los co-cultivos con *D. hansenii* CYC 1021.

*D. hansenii* es una levadura usada de forma importante en procesos biotecnológicos debido, principalmente, a sus características metabólicas (Breuer & Harms, 2006; Aggarwal & Mondal, 2009). Actualmente, esta especie está considerada un microorganismo no patógeno ya que algunos autores defienden que las escasas veces que se han descrito infecciones oportunistas causadas por esta levadura se debían a que los aislamientos habían sido mal clasificados y en realidad se correspondían con otros patógenos fúngicos comunes (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008). Además, la actividad antagonista de *D. hansenii* frente a diferentes contaminantes fúngicos ha sido estudiada desde hace tiempo. La eficacia de distintas cepas de esta levadura como agentes de biocontrol frente a patógenos incluidos en el género *Penicillium* en diferentes frutas se ha destacado en varias ocasiones (Droby *et al.*, 1989; Chalutz & Wilson, 1990; Domenech *et al.*, 2010; Hernández-Montiel *et al.*, 2010). Recientemente, Liu & Tsao (2009) han descrito también la aplicación de *D. hansenii* para el control de hongos contaminantes en productos lácteos.

Posteriormente, se llevaron a cabo distintos estudios para ver el efecto que podían tener la salinidad y la temperatura sobre la actividad antagonista del agente seleccionado, *D. hansenii* CYC 1244, frente a *A. westerdijkiae*. El aumento de la salinidad supuso una disminución del crecimiento del hongo cuando la levadura estaba presente en el medio. *D. hansenii* se ha caracterizado como una levadura con actividad *killer* al ser capaz de secretar una toxina que afecta a distintos microorganismos sensibles que presenten los receptores adecuados en su pared celular (Marquina *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002). La acción de esta toxina *killer* está asociada a unas condiciones de salinidad, pH y temperatura muy determinadas que son las que se usaron en este estudio (Marquina *et al.*, 2001). En principio, se podría pensar que la reducción en el crecimiento de *A. westerdijkiae* podría estar mediado por este mecanismo. Sin embargo, los estudios llevados a cabo con la toxina purificada, en los que el hongo no se ve afectado descartan la implicación de las toxinas *killer* en la actividad antagonista de *D. hansenii* CYC 1244 frente a *A. westerdijkiae*. Distintos autores han comprobado como los efectos de las toxinas *killer* de levaduras sobre hongos filamentosos son muy diferentes de unos casos a otros. Por ejemplo, Walker *et al.* (1995) y Santos & Marquina (2004) vieron un efecto antagonista de varias levaduras de los géneros *Pichia* y *Saccharomyces* frente a distintos hongos patógenos, mientras que Dabhole & Joishy (2005) determinaron que no existía un efecto antagonista por estas toxinas en la reducción del crecimiento de especies de *Fusarium* y *Aspergillus*, lo que coincide con los resultados encontrados en este trabajo. Por otro lado, *D. hansenii* es una levadura



osmotolerante (Aggarwal & Mondal, 2009), por lo que puede crecer con facilidad en condiciones de alta salinidad que no son demasiado adecuadas para el crecimiento del hongo de estudio. Por tanto, el mecanismo más probable para esta reducción tan importante en el crecimiento debido a la presencia de la levadura sea la competencia ya que las condiciones para su crecimiento son mejores y puede proliferar rápidamente impidiendo el desarrollo de *A. westerdijkiae*. La competencia por los nutrientes ya ha sido señalada por muchos autores como el mecanismo más probable en el biocontrol de hongos por levaduras (Spadaro & Gullino, 2004; Zhou *et al.*, 2007).

La temperatura también supuso un efecto importante sobre la capacidad de *D. hansenii* para reducir el crecimiento de *A. westerdijkiae*. La reducción en el diámetro de la colonia fue mucho más drástica a 20 °C que a 28 °C, lo que de nuevo es una evidencia de que el posible mecanismo implicado en el biocontrol sea la competencia por los nutrientes. La temperatura óptima de crecimiento de *D. hansenii* se sitúa cerca de los 20 °C (Aggarwal & Mondal, 2009) por lo que en estas condiciones prolifera rápidamente impidiendo el desarrollo del hongo. Sin embargo, 28 °C es una temperatura mucho más adecuada para el crecimiento de *A. westerdijkiae* (Abdel-Hadi & Magan, 2009) lo que le permite desarrollarse en mejores condiciones.

*D. hansenii* CYC 1244 no sólo es capaz de controlar el crecimiento del hongo en placas de medio sintético, sino que también reduce su proliferación en un sustrato natural como son las uvas. La presencia de *D. hansenii* supuso un menor crecimiento de *A. westerdijkiae*, medido como una menor detección del hongo mediante el ensayo de PCR a tiempo real específico diseñado en esta tesis. La aplicación de esta levadura sobre un sustrato natural ya fue descrita por Domenech *et al.* (2010) para el control de *Penicillium expansum* en manzanas, donde se producía una disminución muy significativa de la lesión producida por el hongo cuando estaba presente la levadura. Los resultados obtenidos en esta tesis pueden dar idea de una posible aplicación de *D. hansenii* CYC 1244 para el control de este hongo durante el almacenamiento de los productos alimentarios y así impedir el crecimiento del mismo y, por tanto, la producción de OTA.

La actividad antagonista de *D. hansenii* CYC 1244 también supuso un destacable efecto en la reducción de la OTA en medio CYA cuando se co-cultivaba con *A. westerdijkiae*, llegándose a reducir hasta niveles por debajo de los detectables por el método utilizado. Diversos autores han analizado los mecanismos que pueden estar implicados en la capacidad de reducir la OTA por parte de

distintos géneros de levaduras (Bejaoui *et al.*, 2004; Molnar *et al.*, 2004; Garcia-Moruno *et al.*, 2005; Angioni *et al.*, 2007; Péteri *et al.*, 2007; Nuñez *et al.*, 2008). En este trabajo, se ha hecho un estudio en profundidad sobre los métodos que podrían estar implicados en esta importante reducción de la toxina en el medio por la presencia de *D. hansenii* CYC 1244.

Como ya se ha comentado, O'Callaghan *et al.* (2003, 2006) describieron algunos genes implicados en la ruta de síntesis de OTA en *A. westerdijkiae*. Según los autores, la expresión de los genes *pks* y *p450-B03* se correlacionaban con los niveles de OTA detectados en el medio por lo que se podían considerar buenos indicadores de la producción de toxina por parte del hongo. Las dos cepas de *A. westerdijkiae* analizadas redujeron la expresión de ambos genes implicados en la biosíntesis de OTA cuando eran co-cultivadas con *D. hansenii* CYC 1244. La respuesta fue diferente en cada aislamiento aunque se observó una reducción de al menos un 59% en la expresión del gen *pks* y de un 46% en *p450-B03*. Estos resultados nos indican claramente que la presencia de esta levadura supone una disminución en la producción de OTA en *A. westerdijkiae*. Hua *et al.* (1999) describieron una reducción en la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* en presencia de levaduras saprofitas debido al bloqueo de algún paso de la ruta biosintética de la toxina. La interrupción de la síntesis de OTA de *A. westerdijkiae* por *D. hansenii* CYC 1244 puede ser uno de los mecanismos implicados en la reducción de la concentración en el medio observada aunque el bloqueo no sería total ya que el hongo puede seguir produciendo toxina. Habría que llevar a cabo más estudios para dilucidar cuál es el punto donde está afectada la síntesis y el mecanismo por la que se lleva a cabo.

En numerosas ocasiones se ha visto que los microorganismos son eficaces agentes descontaminantes de OTA debido a que son capaces de eliminarla por distintos mecanismos (Bata & Lasztity, 1999; Amézqueta *et al.*, 2009; Kabak & Dobson, 2009). La posibilidad de que se estuviera produciendo adsorción y/o absorción de la OTA por parte de *D. hansenii* CYC 1244 fue estudiada en este trabajo. La adsorción a la pared celular es uno de los mecanismos más importantes implicados en la destoxificación de OTA por levaduras y en varias ocasiones se ha demostrado que *Saccharomyces cerevisiae* elimina la toxina de esta manera durante la fermentación del mosto y el vino (Bejaoui *et al.*, 2004; Garcia Moruno *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2006; Cecchini *et al.*, 2006; Bizaj *et al.*, 2009). El pH fue el factor más importante en la eliminación de OTA por las células de levaduras tanto vivas como muertas por calor. La adsorción supone una unión directa entre la toxina y algún componente de la pared celular por lo que cambios en el pH pueden

cambiar el estado de ionización de alguno de los intervinientes en la interacción y, por tanto, impedir que puedan entrar en contacto (Chojnacka, 2010). En varias ocasiones se ha visto que un pH ácido favorece la adsorción de la OTA a la pared celular de las levaduras (Bejaoui *et al.*, 2004; Shetty & Jespersen, 2006). En este estudio se ha visto como con un pH=3 la OTA es eliminada rápidamente del extracto y a los 5 min se ha reducido en más de un 90%. Cuando el ensayo se llevó a cabo a pHs más elevados (5 y 7) se observó una gran variabilidad en los niveles de toxina del extracto probablemente debido al cambio en el estado de ionización de las moléculas que produciría inestabilidad en la unión entre la toxina y la pared celular. Todo esto induce a pensar que otro mecanismo implicado en la reducción de la OTA por *D. hansenii* CYC 1244 sea la adsorción de la toxina a su superficie celular. Hasta el momento, varios autores han comprobado que hay distintas fracciones de la pared de levaduras cerviceras que son capaces de unirse a esta micotoxina como los  $\beta$ -glucanos (Ringot *et al.*, 2005; Yiannikouris *et al.*, 2006), las manoproteínas (Caridi, 2006) o la quitina (Bornet & Teissedre, 2007). En este caso, habrá que llevar a cabo más estudios para fraccionar y caracterizar los componentes de la pared de *D. hansenii* CYC 1244 y llevar a cabo ensayos para comprobar si son capaces de destoxificar la OTA.

Por otro lado, Meca *et al.* (2010) observaron que *S. cerevisiae* también era capaz de incorporar la OTA al interior celular llevando a cabo el fenómeno de absorción. En este ensayo, no encontramos diferencias entre los resultados utilizando células viables y muertas por calor lo que sugiere que no se está produciendo absorción al interior celular. Únicamente las células viables son capaces de internalizar la toxina debido a que es un proceso metabólicamente activo que, por tanto, las células muertas no pueden realizar (Chojnacka, 2010). Además, la marcada reducción que se produce tras 5 min de incubación sugiere que se está produciendo adsorción y no absorción al interior celular ya que este último es un fenómeno lento que hubiera requerido mucho más tiempo (Chojnacka, 2010).

Varios autores han comprobado la capacidad de distintos géneros de levaduras para producir enzimas que degradan la OTA, bien del tipo de las carboxipeptidasas liberando OT- $\alpha$  (Molnar *et al.*, 2004; Péteri *et al.*, 2007) u otras enzimas cuya función no se conoce hasta el momento (Angioni *et al.*, 2007). En este trabajo, no se han encontrado evidencias de que *D. hansenii* CYC 1244 produzca enzimas que degraden la OTA ya que no hay diferencias entre las mezclas control y las de mezclas de los extractos de toxina y los metabolitos producidos por las levaduras. Además, en los cromatogramas no aparecen evidencias de la presencia de OT- $\alpha$  u

otras moléculas diferentes cuando *A. westerdijkiae* se cultiva junto con *D. hansenii* CYC 1244.

Los métodos biológicos tanto para el control de la proliferación fúngica como para la destoxificación de los productos contaminados están considerados como buenas alternativas a los fungicidas y a los procesos químicos para prevenir la presencia de OTA en los alimentos (Pal & Gardener, 2006; Amézqueta *et al.*, 2009). La OTA es un compuesto muy estable que resiste los tratamientos habituales de procesamiento de alimentos. Actualmente, no existen métodos de descontaminación que no varíen las propiedades organolépticas de los alimentos por lo que la prevención es la estrategia más importante para evitar que la toxina entre en la cadena alimentaria (Amézqueta *et al.*, 2009). *D. hansenii* CYC 1244 podría ser un buen agente de biocontrol frente a *A. westerdijkiae* ya que no sólo es capaz de reducir el crecimiento del hongo sino también afecta a su capacidad de producir OTA. Dimakopoulou *et al.* (2008) desarrollaron un método para dispersar en el campo levaduras con propiedades de biocontrol frente a *A. carbonarius* y comprobaron que este tratamiento era tan eficiente como los fungicidas para controlar el crecimiento fúngico. Este mismo mecanismo podría ser útil para dispersar *D. hansenii* CYC 1244 en un lugar donde estuvieran almacenados productos susceptibles a la contaminación por *A. westerdijkiae* y comprobar si realmente es capaz de reducir su crecimiento y su producción de OTA *in vivo*.

Por otro lado, el agente de biocontrol seleccionado en este trabajo también podría ser utilizado para destoxificar la OTA en productos alimenticios porque es capaz de eliminar la toxina mediante su adsorción a su pared. Habría que llevar a cabo más estudios para lograr la aplicación tecnológica de este hallazgo que podría ser especialmente útil para la descontaminación de la toxina en bebidas utilizando, por ejemplo, una columna con paredes de *D. hansenii* CYC 1244 inmovilizadas por las que se pasaría el producto y la OTA quedaría retenida.

Por tanto, en este trabajo, se ha estudiado detalladamente a *D. hansenii* CYC 1244 como agente de biocontrol frente a *A. westerdijkiae*. El efecto sobre el crecimiento parece ser debido a la competencia por los nutrientes, mientras que en la reducción en la concentración de OTA parecen estar implicados dos mecanismos, la reducción en la producción por parte del hongo y la adsorción de la toxina a la pared de la levadura.



Conclusiones



1. Se han desarrollado ensayos específicos de PCR para la discriminación de las principales especies productoras de OTA de *Aspergillus* sección Circumdati, *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* y *A. steynii*. Mediante la aplicación de estas técnicas se han reclasificado numerosos aislamientos. Por tanto, estas herramientas serían muy útiles para realizar un diagnóstico preciso de estas especies y para la revisión de aislamientos en colecciones de cultivo.

2. Los ensayos específicos de PCR descritos se han aplicado con éxito para la detección de *A. ochraceus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae* en muestras naturales como harinas de cebada y pimentón donde más de una de estas especies fue detectada.

3. Se ha diseñado y optimizado un ensayo de PCR a tiempo real, rápido y específico, para la detección y cuantificación de *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* en uvas y granos de café verde utilizando SYBR Green I como sistema de detección. Este protocolo es altamente sensible y se ha demostrado que es una buena herramienta para la detección temprana de estas importantes especies productoras de OTA. Los niveles de contaminación fúngica podrían utilizarse para predecir la presencia de OTA en sustratos susceptibles a la colonización por *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus*.

4. El análisis de la capacidad de producir OTA de las principales especies de *Aspergillus* sección Circumdati ha demostrado que *A. westerdijkiae* y, particularmente, *A. steynii* deben ser consideradas como el mayor riesgo de contaminación por OTA debido a su elevada capacidad de producción y al alto porcentaje de aislamientos productores. Sin embargo, el riesgo de contaminación por OTA debido a *A. ochraceus* también debe de ser tenido en cuenta ya que algunas cepas son capaces de producir la toxina.

5. La composición del sustrato de los medios basados en matrices alimentarias no afectó al crecimiento tanto en *A. westerdijkiae* como en *A. steynii*. *A. westerdijkiae* alcanzó un mayor crecimiento que *A. steynii* en todas las condiciones ensayadas. El crecimiento aumentó en ambos casos al incrementarse la  $a_w$  y la temperatura.



6. Todos los factores ecofisiológicos analizados (temperatura,  $a_w$  y sustrato) afectaron de manera significativa a la producción de OTA en ambas especies aunque se encontraron diferencias cuantitativas y cualitativas entre ellas. *A. steynii* fue capaz de producir OTA en un rango más amplio de condiciones y siempre en mayor cantidad que *A. westerdijkiae*. Los niveles más altos de concentración de toxina se obtuvieron en los medios preparados a partir de pimentón y de cebada, por lo que estas matrices deberían ser especialmente controladas para evitar su contaminación por estos hongos.

7. La expresión de tres genes posiblemente implicados en la ruta de síntesis de OTA (*pks*, *p450-B03* y *nrps*) han sido caracterizados en *A. westerdijkiae*. Sus patrones de expresión se analizaron mediante RT-PCR a tiempo real en condiciones inductoras de producción de OTA en varias cepas de *A. westerdijkiae* y se encontró una relación significativa con los niveles de OTA extracelular medidos por HPLC.

8. Utilizando la técnica 5'-RACE, se ha obtenido la secuencia de un gen que codifica para una citocromo p450 monooxigenasa en *A. steynii*. Este gen podría estar implicado en la biosíntesis de OTA en este hongo. Sus niveles de expresión se analizaron por RT-PCR a tiempo real y se observó que se relacionaban significativamente con la síntesis de OTA.

9. Se ha seleccionado la cepa CYC 1244 de *D. hansenii* como un posible agente de biocontrol frente a *A. westerdijkiae* ya que es capaz de reducir el crecimiento del hongo en una gran variedad de condiciones y su presencia disminuye la concentración de OTA extracelular. Los mecanismos más probablemente implicados en la reducción de la toxina son una disminución en la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de OTA en *A. westerdijkiae* y la adsorción de OTA a la pared celular de la levadura.

Conclusions



1. Three specific PCR assays were developed to discriminate among the main OTA-producing species of *Aspergillus* section Circumdati: *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. steynii*. Several isolates were reclassified with the application of these protocols; therefore, these tools can be very useful for accurate diagnosis and to revise culture collections.

2. The specific PCR protocols described were applied successfully to detect *A. ochraceus*, *A. steynii* and *A. westerdijkiae* in natural samples, such as paprika and barley flour where more than one species were detected.

3. A rapid and specific real time PCR protocol was developed and optimized to detect and quantify *A. westerdijkiae* and *A. ochraceus* in grapes and green coffee beans using SYBR Green I chemistry. This protocol was proven to be highly sensitive and provides a good tool for early detection of these important OTA-producing species. Fungal contamination levels could be related with OTA risk on substrates susceptible to be colonized by these species.

4. The analysis of OTA producing ability of the main species of *Aspergillus* section Circumdati showed that *A. westerdijkiae* and, particularly *A. steynii*, should be considered the major risk of OTA contamination due to their high production levels and their high percentage of producing strains. However, OTA risk due to *A. ochraceus* cannot be disregarded since some strains were also OTA producers.

5. The composition of the substrate in different matrix-based media did not show any effect on growth of both *A. westerdijkiae* and *A. steynii*. *A. westerdijkiae* achieved a higher growth than *A. steynii* in all conditions tested. In both cases, growth was increased with temperature and  $a_w$  values.

6. All ecophysiological factors analyzed (temperature,  $a_w$  and substrate) affected significantly OTA production by *A. westerdijkiae* and *A. steynii*, although there were quantitative and qualitative differences between them. *A. steynii* was able to produce OTA in a wider range of conditions and at higher levels than *A. westerdijkiae*. The highest OTA concentration was found in paprika and barley media; therefore, these matrices should be specially controlled to avoid contamination by these fungi.

7. The expression of three genes putative involved in the OTA biosynthetic pathway (*pks*, *p450-B03* and *nrps*) were characterized in *A. westerdijikiae*. Their expression patterns were examined by real time RT-PCR in OTA-inducing conditions in several *A. westerdijikiae* strains and they were significantly correlated to the OTA extracellular levels analyzed by HPLC.

8. Using the 5'-RACE technique, the sequence of a gene encoding a cytochrome p450 monooxygenase was obtained in *A. steynii*. This gene might be involved in OTA biosynthesis in this fungus. Its expression levels were analyzed by real time RT-PCR and significantly correlated to OTA synthesis.

9. The strain CYC 1244 of *D. hansenii* was selected as a potential biocontrol agent against *A. westerdijikiae* since it was able to reduce fungal growth in a variety of conditions and its presence decreased the extracellular concentration of OTA. The most likely mechanisms involved in toxin reduction were the effect on expression of biosynthetic genes in *A. westerdijikiae* and OTA adsorption to the yeast cell wall.

# Bibliografía



- Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ, 2003.** *Aspergillus carbonarius as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market.* Journal of Food Protection 66, 504-506.
- Abbas HK, Zablotowicz RM, Bruns HA, Abel CA, 2006.** *Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic Aspergillus flavus isolates.* Biocontrol Science and Technology 16, 437-449.
- Abbas HK, Zablotowicz RM, Bruns HA, 2008.** *Modelling the colonization of maize by toxigenic and non-toxigenic Aspergillus flavus strains: implications for biological control.* World Mycotoxin Journal 1, 333-340.
- Abdel-Hadi A, Magan N, 2009.** *Influence of physiological factors on growth, sporulation and ochratoxin A/B production of the new Aspergillus ochraceus grouping.* World Mycotoxin Journal 2, 429-434.
- Abdin MZ, Ahmad MM, Javed S, 2010.** *Advances in molecular detection of Aspergillus: an update.* Archives of Microbiology 192, 409-25.
- Abrunhosa L, Serra R, Venâncio A, 2002.** *Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 7493-7496.
- Abrunhosa L, Venâncio A, 2007.** *Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from Aspergillus niger.* Biotechnology Letters 29, 1909-1914.
- Abrunhosa L, Paterson RRM, Venâncio A, 2010.** *Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination.* Toxins 2, 1078-1099.
- Aggarwal M, Mondal AK, 2009.** *Debaryomyces hansenii: an osmotolerant and halotolerant yeast.* En: Yeast biotechnology: diversity and applications. Satyanarayana T, Kunze G (Eds.). Springer Science Business Media, Nueva York, EEUU. Págs. 65-84.
- Aldred D, Cairns-Fuller V, Magan N, 2008.** *Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by Penicillium verrucosum and Aspergillus westerdijkiae on wheat grain.* Journal of Stored Products Research 44, 341-346.
- Almela L, Rabe V, Sánchez B, Torrella F, López-Pérez JP, Gabaldón JA, Guardiola L, 2007.** *Ochratoxin A in red paprika: relationship with the origin of the raw material.* Food Microbiology 24, 319-327.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997.** *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.* Nucleic Acids Research 25, 3389-3402.
- Amézqueta S, González-Peñas E, Murillo-Arbizu M, López de Cerain A, 2009.** *Ochratoxin A decontamination: a review.* Food Control 20, 326-333.



- Angioni A, Caboni P, Garau A, Farris A, Orro D, Budroni M, Cabras P, 2007.** *In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of Saccharomyces cerevisiae and Klöeckera apicultata.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 2043-2048.
- Anli E, Alkis IM, 2010.** *Ochratoxin A and brewing technology: a review.* Journal of the Institute of Brewing 116, 23-32.
- Araguás C, González-Peñas E, López de Cerain A, 2005.** *Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain.* Food Chemistry 92, 459-464.
- Ariño A, Herrera M, Estopañan G, Juan T, 2007.** *High levels of ochratoxin A in licorice and derived products.* International Journal of Food Microbiology 114, 366-369.
- Asao T, Buchi G, Abdel-Keder MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN, 1963.** *Aflatoxins B and G.* Journal of the American Chemical Society 85: 1705-1707.
- Atoui A, Mathieu F, Lebrihi A, 2007.** *Targeting a polyketide synthase gene for Aspergillus carbonarius quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR.* International Journal of Food Microbiology 115, 313-318.
- Bacha N, Atoui A, Mathieu F, Liboz T, Lebrihi A, 2009.** *Aspergillus westerdijckiae polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A.* Fungal Genetics and Biology 46, 77-84.
- Bailly JD, Guerre P, 2009.** *Mycotoxins in meat and processed meat products.* En: Safety of Meat and Processed Meat. Toldrá F (Ed.). Springer, Nueva York, EEUU. Págs. 83-124.
- Baliukoniene V, Bakutis B, Stankevicius H, 2003.** *Mycological and mycotoxicological evaluation of grain.* Annals of Agricultural and Environmental Medicine 10, 223-227.
- Barberis C, Astorteca A, Fernández-Juri MG, Dalcero AM, Magnoli C, 2010.** *Effect of antioxidant mixtures on growth and ochratoxin A production of Aspergillus section Nigri species under different water activity conditions on peanut meal extract agar.* Toxins 2, 1399-1413.
- Barlow S, Bolger PM, Pitt JI, Verger P, 2008.** *Ochratoxin A (addendum).* En: Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives series 59. OMS (Ed.). WHO Library, Génova, Italia.
- Bata A, Lasztity R, 1999.** *Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms.* Trends in Food Science and Technology 10, 223-228.
- Batista LR, Chalfoun SM, Prado G, Schwan RF, Wheals AE, 2003.** *Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (Coffea arabica L.).* International Journal of Food Microbiology 85, 293-300.

- Batista LR, Chalfoun SM, Silva CF, Cirillo M, Varga EA, Schwan RF, 2009.** *Ochratoxin A in coffee beans (Coffea arabica L.) processed by dry wet methods.* Food Control 20, 784-790.
- Battacone G, Nudda A, Pulina G, 2010.** *Effects of ochratoxin A on livestock production.* Toxins 2, 1796-1824.
- Battilani P, Pietri A, 2002.** *Ochratoxin A in grapes and wine.* European Journal of Plant Pathology 108, 639-643.
- Battilani P, Giorni P, Bertuzzi T, Formenti S, Pietri A, 2006a.** *Black Aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy.* International Journal of Food Microbiology 111, S53-S60.
- Battilani P, Magan N, Logrieco A, 2006b.** *European research on ochratoxin A in grapes and wine.* International Journal of Food Microbiology 111, S2-S4.
- Battilani P, Pietri A, Giorni P, Formenti S, Bertuzzi T, Toscani T, Virgili R, Kozakiewicz Z, 2007.** *Penicillium populations in dry-cured ham manufacturing plants.* Journal of Food Protection 70, 975-980.
- Bau M, Castellá G, Bragulat MR, Cabañes FJ, 2006.** *RFLP characterization of Aspergillus niger aggregate species from grapes from Europe and Israel.* International Journal of Food Microbiology 111, S18-S21.
- Bayman P, Baker JL, Doster MA, Michailides TJ, Mahoney NE, 2002.** *Ochratoxin production by the Aspergillus ochraceus group and Aspergillus alliaceus.* Applied and Environmental Microbiology 68, 2326-2329.
- Beardall JM, Miller JD, 1994.** *Diseases in humans with mycotoxins as possible causes.* En: Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin. Miller JD, Trenholm HL (Eds.). Eagan Press, Saint Paul, EEUU. Págs. 487-539.
- Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A, 2004.** *Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological Saccharomyces strains.* Journal of Applied Microbiology 97, 1038-1044.
- Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A, 2005.** *Conidia of black Aspergilli as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts.* Journal of Agricultural and food chemistry 53, 8224-8229.
- Belajová E, Drahomíra R, Dasko L, 2007.** *Retention of ochratoxin A and fumonisin B1 and B2 from beer on solid surfaces: comparison of efficiency of adsorbents with different origin.* European Food Research and Technology 224, 301-308.

- Bellí N, Pardo E, Marín S, Farré G, Ramos AJ, Sanchis V, 2004.** *Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes.* Journal of the Science of Food and Agriculture 84, 541-546.
- Bellí N, Ramos AJ, Coronas I, Sanchis V, Marín S, 2005.** *Aspergillus carbonarius growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors.* Journal of Applied Microbiology 98, 839-844.
- Bellí N, Bau M, Marín S, Abarca ML, Ramos AJ, Bragulat MR, 2006.** *Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes.* International Journal of Food Microbiology 111, S40-S45.
- Bennett JW, Klich M, 2003.** *Mycotoxins.* Clinical Microbiology Reviews 16, 497-516.
- Bhatnagar D, Payne GA, Cleveland TE, Robens JF, 2004.** *Mycotoxins: current issues in USA.* En: Meeting the mycotoxin menace. Barug D (Ed.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Holanda. Págs. 17-47.
- Biffi R, Munari M, Dioguardi L, Ballabio C, Cattaneo A, Galli CL, Restani P, 2004.** *Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market, 2001-02.* Food Additives and Contaminants 21, 586-591.
- Bircan C, 2009.** *Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs.* Food and Chemical Toxicology 47, 1996-2001.
- Bizaj E, Mavri J, Cus F, Raspor A, 2009.** *Removal of ochratoxin A in Saccharomyces cerevisiae liquid cultures.* South African Journal for Enology and Viticulture 30, 151-155.
- Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A, Visconti A, 2006.** *Isolation of epiphytic yeast with potential for biocontrol of Aspergillus carbonarius and A. niger on grape.* International Journal of Food Microbiology 108, 204-209.
- Bluhm B, Woloshuk C, 2005.** *Starch influences fumonisin production by Fusarium verticillioides during colonization of maize kernels.* Phytopathology 95, 1333-1339.
- Bogs C, Battilani P, Geisen R, 2006.** *Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing Penicillium species and its application to analyse the occurrence of Penicillium nordicum in cured meats.* International Journal of Food Microbiology 107, 39-47.
- Boorman G, McDonald MR, Imoto S, Persing R, 1992.** *Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 Rat.* Toxicologic Pathology 20, 236-245.
- Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM, 2008.** *Molecular identification of pathogenic fungi.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, i7-i12.

- Bornet A, Teissedre PL, 2007.** *Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines.* European Food Research and Technology 226, 681-689.
- Bowteii D, Sambrook J, 2003.** *DNA microarrays: a molecular cloning manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EEUU.
- Bouaziz C, Chouchane S, Jomaa M, Bacha H, 2010.** *Ochratoxin A levels in spices and dried nuts consumed in Tunisia.* Food Additives and Contaminants. Part B, Surveillance 3, 52-57.
- Boudra H, Le Bars P, Le Bars J, 1995.** *Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions.* Applied and Environmental Microbiology 61, 1156-1158.
- Boudra H, Barnouin J, Dragacci S, Morgavi DP, 2007.** *Aflatoxin M<sub>1</sub> and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds.* Journal of Dairy Science 90, 3197-3201.
- Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ, 2001.** *An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture.* International Journal of Food Microbiology 71, 139-144.
- Bragulat MR, Martínez E, Castellá G, Cabañes FJ, 2008.** *Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus Penicillium from feedstuffs.* International Journal of Food Microbiology 126, 43-48.
- Breuer U, Harms H, 2006.** *Debaryomyces hansenii – an extremophilic yeast with biotechnological potential.* Yeast 23, 415-437.
- Bridge P, 2002.** *The history and application of molecular mycology.* Mycologist 16, 90-99.
- Brodhagen M, Keller NP, 2006.** *Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation.* Molecular Plant Pathology 7, 285-301.
- Brown MH, Szczech GM, Purmalis BP, 1976.** *Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats.* Toxicology and Applied Pharmacology 37, 331-338.
- Bruinink A, Rasonyi T, Sidler C, 1998.** *Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha in vitro.* Natural Toxins 6, 173-177.
- Bryden WL, 2007.** *Mycotoxins in the food chain: human health implications.* Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 16, 95-101.
- Buchanan RL, Tice G, Marino D, 1982.** *Caffeine inhibition of ochratoxin A production.* Journal of Food Science 47, 319-321.
- Bucheli P, Taniwaki MH, 2002.** *Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee.* Food Additives and Contaminants 19, 655-665.

- Cabañas R, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Cabañes FJ, 2008.** *Occurrence of Penicillium verrucosum in retail wheat flours from the Spanish market.* Food Microbiology 25, 642-647.
- Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Minguéz S, Pons A, 2002.** *What is the source of ochratoxin A in wine?.* International Journal of Food Microbiology 79, 213-215.
- Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G, 2010.** *Ochratoxin A producing species in the genus Penicillium.* Toxins 2, 1111-1120.
- Caridi A, 2006.** *Enological functions of parietal yeast mannoproteins.* Antonie van Leeuwenhoek 89, 417-422.
- Caridi A, Galvano F, Tafuri A, Ritieni A, 2006.** *Ochratoxin removal during winemaking.* Enzyme and Microbial Technology 40, 122-126.
- Carmo ES, Lima EO, Souza EL, 2008.** *The potential of Origanum vulgare L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related Aspergillus species.* Brazilian Journal of Food Microbiology 39, 362-367.
- CAST, 2003.** *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems.* Force Report N° 139. Council for Agricultural Science and Technology, Iowa, USA.
- Casteel SW, Braun WF, 1992.** *Mycotoxicoses.* En: Encyclopedia of Microbiology. Lederberg J (Ed.). Academic Press, Nueva York, EEUU. Págs. 217-227.
- Castegnaro M, Canadas D, Vrabcheva T, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Pfohl-Leszkowicz A, 2006.** *Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers.* Molecular Nutrition and Food Research 50, 519-529.
- Cecchini F, Morassut M, García Moruno E, Di Stefano R, 2006.** *Influence of yeast on ochratoxin A content during fermentation of white and red must.* Food Microbiology 23, 411-417.
- Chalutz E, Wilson CL, 1990.** *Postharvest Biocontrol of Green and Blue Mold and Sour Rot of Citrus Fruit by Debaryomyces hansenii.* Plant Disease 74, 134-137.
- Chelkowski J, Samson RA, Wiewiorowska M, Golinski P, 1987.** *Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of Aspergillus glaucus Link ex Grey (=Eurotium herbariorum Wiggers Link ex Grey) from cereal grains.* Die Nahrung 31, 267-270.
- Chiang YM, Oakley BR, Keller NP, Wang CCC, 2010.** *Unraveling polyketide synthesis in members of the genus Aspergillus.* Applied Microbiology and Biotechnology 86, 1719-1736.

- Chojnacka K, 2010.** *Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications.* Environment International 36, 299-307.
- Christensen CM, 1970.** *Ergot and Ergotisme.* En: Christensen CM (Ed.). *Molds, mushrooms and mycotoxins.* Burns & MacEachern, Ontario, Canadá. Págs. 34-58.
- Christensen M, Raper KB, 1978.** *Aspergillus robustus, a new species in the A. ochraceus group.* Mycologia 70, 200-205.
- Chu FS, Bhatnagar D, 2003.** *Mycotoxins.* En: *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications.* Arora DK (Ed.). CRC Press, Miami, EEUU. Págs. 531-562.
- Chulze SN, Magnoli CE, Dalcero AM, 2006.** *Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America.* International Journal of Food Microbiology 111, S5-S9.
- Ciegler A, 1972.** *Production of ochratoxin A and penicillic acid by members of the Aspergillus ochraceus group.* Canadian Journal of Microbiology 18, 631-638.
- Clark HA, Snedeker SM, 2006.** *Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure.* Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews 9, 265-296.
- Comisión Codex Alimentarius, 1999.** *Position paper on ochratoxin A.* Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes, sesión 31ª. La Haya, Holanda.
- Comisión Codex Alimentarius, 2002.** *Proposed draft code of practice for the prevention (reduction) of mycotoxin contamination in cereals, including annexes of ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichotecenes, CX/FAC 02/21.* Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rotterdam, Holanda.
- Comisión Europea, 2001.** *Reglamento (CE) Nº 466/2001 de 8 de marzo de 2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea, 2002a.** *Reglamento (CE) Nº 178/2002 de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea, 2002b.** *Reglamento (CE) Nº 472/2002 de 12 de marzo de 2002 que modifica el Reglamento (CE) Nº 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea, 2004.** *Reglamento (CE) Nº 683/2004 de 13 de abril de 2004 que modifica el Reglamento (CE) Nº 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas y a la*

ocratoxina A en los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2005a.** *Reglamento (CE) N° 123/2005 de 26 de enero de 2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 con respecto a la ocratoxina A.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2005b.** *Reglamento (CE) N° 396/2005 de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2006a.** *Reglamento (CE) N° 401/2006 de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2006b.** *Reglamento (CE) N° 1881/2006 de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2007.** *Reglamento (CE) N° 1126/2007 de 28 de septiembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de Fusarium en maíz y los productos del maíz.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2008.** *Reglamento (CE) N° 299/2008 de 11 de marzo de 2008 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 396/2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2010a.** *Reglamento (UE) N° 105/2010 de 5 de febrero de 2010 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a la ocratoxina A.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2010b.** *Reglamento (UE) N° 165/2010 de 26 de febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.* Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Comisión Europea, 2010c.** *Reglamento (UE) N° 178/2010 de 2 de marzo de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 401/2006 en lo que respecta a los cacahuetes y otras semillas oleaginosas, a los frutos de cáscara arbóreos, a los huesos de*

*albaricoque, al regaliz y al aceite vegetal*. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

**Copetti MV, Perelra JL, Iamanaka BT, Pitt JI, Taniwaki MH, 2010.** *Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing*. International Journal of Food Microbiology 143, 67-70.

**Coronel MB, Marín S, Cano G, Ramos AJ, Sanchis V, 2011.** *Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: occurrence and assessment of the exposure in Catalonia*. Food Control 22, 414-419.

**Costa J, 2004.** *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22, 299-305.

**Cousin MA, Riley RT, James JP, 2005.** *Foodborne mycotoxins: Chemistry, Biology, Ecology and Toxicology*. En: Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL (Eds.). Caister Academic Press, Wymondham, Reino Unido.

**Creppy EE, 2002.** *Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe*. Toxicology Letters 127, 19-28.

**Cresnar B, Petric S, 2011.** *Cytochrome p450 enzymes in the fungal kingdom*. Biochimica et Biophysica Acta 1, 29-35.

**Czerwiecki L, Czajkowska D, Witkowska-Gwiazdowska A, 2002.** *On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998*. Food Additives and Contaminants 19, 1051-1057.

**Dabhole MP, Joishy KN, 2005.** *Production and effect of killer toxin by Saccharomyces cerevisiae and Pichia kluyveri on sensitive yeast and fungal pathogens*. Indian Journal of Biotechnology 4, 290-292.

**Dalcero A, Magnoli C, Hallak C, Chiacchiera SM, Palacio G, Rosa CAR, 2002.** *Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by Aspergillus section Nigri in Argentina*. Food Additives and Contaminants 19, 1065-1072.

**Dall'Asta C, De Dea Lindner J, Galaverna G, Dossena A, Neviani E, Marchelli R, 2008.** *The occurrence of ochratoxin A in blue cheese*. Food Chemistry 106, 729-734.

**Dall'Asta C, Galaverna G, Bertuzzi T, Moseriti A, Pietri A, Dossena A, Marchelli R, 2009.** *Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet*. Food Chemistry 120, 978-983.



- Dallyn H, Fox A, 1980.** *Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi.* En: Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment. Gould GH, Corry JEL (Eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido. Págs. 129-139.
- Dai JR, Carté BK, Sidebottom PJ, Yew ALS, Ng SB, Huang Y, Butler MS, 2001.** *Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus Aspergillus ochraceus.* Journal of Natural Products 64, 125-126.
- Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F, 2010.** *Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: a review.* Food Control 21, 370-380.
- Dao HP, Mathieu F, Lebrihi A, 2005.** *Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method.* International Journal of Food Microbiology 104, 61-67.
- De Almeida AP, Alaburda J, Shundo L, Ruvieri V, Navas SA, Leda C, Lamardo A, Sabino M, 2007.** *Ochratoxin A in Brazilian instant coffee.* Brazilian Journal of Microbiology 38, 300-303.
- De Costa P, Bezerra P, 2009.** *Fungicides: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects.* Nova Biomedical, Waltham, EEUU.
- Desjardins AE, Proctor RH, 2007.** *Molecular biology of Fusarium mycotoxins.* International Journal of Food Microbiology 119, 47-50.
- Desnos-Ollivier M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, Dromer F, 2008.** *Debaryomyces hansenii (Candida famata), a rare human fungal pathogen often misidentified as Pichia guilliermondii (Candida guilliermondii).* Journal of Clinical Microbiology 46, 3237-3242.
- Dharmadhikari M, 1994.** *Composition of grapes.* Vineyard & Vintage View 9, 3-8.
- Díaz GA, Torres R, Vega M, Latorre BA, 2009.** *Ochratoxigenic Aspergillus species on grapes from Chilean vineyards and Aspergillus threshold levels on grapes.* International Journal of Food Microbiology 133, 195-199.
- Dickens F, Jones HEH, 1963.** *The carcinogenic action of aflatoxin after its subcutaneous injection in the rat.* British Journal of Cancer 17, 691-698.
- Dimakopoulou M, Tjamos SE, Antoniou PP, Pietri A, Battilani P, Avramidis N, Markakis EA, Tjamos EC, 2008.** *Phyllosphere grapevine yeast Aureobasidium pullulans reduces Aspergillus carbonarius (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece.* Biological Control 46, 158-165.
- Dirheimer G, Creppy EE, 1991.** *Mechanism of action of ochratoxin A.* IARC Scientific Publications 115, 171-186.

- D'Mello JPC, MacDonald AMC, 1997.** *Mycotoxins*. Animal Feed Science and Technology 69, 155-166.
- Dohlman E, 2003.** *Mycotoxin Hazards and Regulations. Impacts on Food and Animal Feed Crop Trade*. En: International Trade and Food Safety: Economic Theory and Case Studies. Buzby JC (Ed.). Agricultural Economic Report N° 828. USDA-ERS, Washington, EEUU. Págs. 97-108.
- Domenech M, Vázquez C, González-Jaén MT, Patiño B, 2010.** *Biocontrol of Penicillium expansum with yeast*. En: Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products. Mendez-Vilas A (Ed.). World Scientific Publishing, Singapur, Singapur. Págs. 366-371.
- Droby S, Chalutz E, Wilson CL, Wisniewski M, 1989.** *Characterization of the biocontrol activity of Debaryomyces hansenii in the control of Penicillium digitatum on grapefruit*. Canadian Journal of Microbiology 35, 794-800.
- Droby S, Chalutz E, Wilson CL, Wisniewski ME, 1992.** *Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides*. Phytoparasitica 20, S149-S153.
- Duarte SC, Pena A, Lino CM, 2009.** *Ochratoxin A non-conventional exposure sources – A review*. Microchemical Journal 93, 115-120.
- Duarte SC, Lino CM, Pena A, 2010a.** *Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status*. Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 27, 1440-1450.
- Duarte SC, Pena A, Lino CM, 2010b.** *A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products*. Food Microbiology 27, 187-198.
- Edwards SG, O'Callaghan J, Dobson ADW, 2002.** *PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi*. Mycological Research 106, 1005-1025.
- EFSA, 2006.** *Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food*. The EFSA Journal 365, 1-56.
- El Adlouni C, Tozlovanu M, Naman F, Faid M, Pfohl-Leszkowicz, 2006.** *Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B<sub>1</sub>) in black table olives "Greek style" of Moroccan origin*. Molecular Nutrition and Food Research 50, 507-512.
- El Khoury A, Atoui A, 2010.** *Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status*. Toxins 2, 461-493.

- Elmholt S, Rasmussen PH, 2005.** *Penicillium verrucosum occurrence and ochratoxin A contents in organically cultivated grain with special reference to ancient wheat types and drying practice.* Mycopathologia 159, 421-432.
- El-Tarabily KA, Sivasithamparam K, 2006.** *Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters.* Mycoscience 47, 25-35.
- Espejo F, Vázquez C, Patiño B, Armada S, 2010.** *Ochratoxin A production in aniseed-based media by selected fungal strains and in anise fruits (Pimpinella anisum L.).* Mycotoxin Research 26, 75-84.
- Fairchild A, Lee MD, Maurer JJ, 2006.** *PCR basis.* En: PCR Methods in Food. Maurer JJ (Ed.). Springer, Nueva York, EEUU. Págs. 1-26.
- FAO, 2001.** *Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control.* FAO Food and Nutrition Paper 73, 1-124.
- Fazekas B, Tar A, Kovacs M, 2005.** *Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary.* Food Additives and Contaminants 22, 856-863.
- Feng P, 1997.** *Impact of molecular biology on the detection of foodborne pathogens.* Molecular Biotechnology 7, 267-278.
- Ferracane R, Tafuri A, Logieco A, Galvano F, Balzano D, Ritieni A, 2007.** *Simultaneous determination of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil.* Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 24, 173-180.
- Fraga D, Meulia T, Fenster S, 2008.** *Real-time PCR.* En: Current Protocols Essential Laboratory Techniques. Gallagher SR, Wiley EA (Eds.). John Wiley & Sons, Nueva Jersey, EEUU. Págs. 10.3.1-10.3.34.
- Fratamico PM, Bayles DO, 2005.** *Molecular approaches for detection, identification and analysis of foodborne pathogens.* En: Foodborne Pathogens: Microbiology And Molecular Biology. Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL (Eds.). Horizon Scientific Press, Norfolk, Reino Unido. Págs. 1-15.
- Frisvad JC, Frank JM, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Samson RA, 2004.** *New ochratoxin A producing species of Aspergillus section Circumdati.* Studies in Mycology 50, 23-43.
- Frisvad JC, Nielsen KF, Samson RA, 2006.** *Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds.* Advances in Experimental Medicine and Biology 571, 33-46.
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR, 1989.** *Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.*

- Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA, 1985.** *Infrageneric taxa of Aspergillus*. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Samson RA, Pitt JI (Eds.). Plenum Press, Nueva York, EEUU. Págs. 55-62.
- Gallo A, Perrone G, Solfrizzo M, Epifani F, Abbas A, Dobson ADW, Mulè G, 2009.** *Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 129, 313-318.
- García-Moruno E, Sanlorenzo C, Boccaccino B, Di Stefano R, 2005.** *Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine*. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 73-76.
- Geisen R, Mayer Z, Karolewicz A, Färber P, 2004.** *Development of a real time PCR system for detection of Penicillium nordicum and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene*. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 501-507.
- Geisen R, Schmidt-Heydt M, Karolewicz A, 2006.** *A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in Penicillium*. *Mycotoxin Research* 22, 134-141.
- Geisen R, Schmidt-Heydt M, 2009.** *Physiological and molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis*. En: *The Mycota, Vol. 15: Physiology and Genetics - Selected Basic and Applied Aspects*. Anke T, Weber D (Eds.). Springer, Berlín, Alemania. Págs. 353-376.
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA, 2007.** *The current status of species recognition and identification in Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59, 1-10.
- Ginzinger DG, 2002.** *Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream*. *Experimental Hematology* 30, 503-512.
- Glass NL, Donaldson GC, 1995.** *Development of primer sets designed for the use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323-1330.
- González-Salgado A, Patiño B, Vázquez C, González-Jaén MT, 2005.** *Discrimination of Aspergillus niger and other Aspergillus species belonging to section Nigri by PCR assays*. *FEMS Microbiology Letters* 245, 353-361.
- González-Salgado A, 2009.** *Diagnóstico y control de especies de Aspergillus productoras de ocratoxina A*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- González-Salgado A, Patiño B, Gil-Serna J, Vázquez C, González-Jaén MT, 2009.** *Specific detection of Aspergillus carbonarius by SYBR® Green and TaqMan®*

quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. FEMS Microbiology Letters 295, 57–66.

**Grazioli B, Fumi MD, Silva A, 2006.** *The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: a study on naturally contaminated grapes.* International Journal of Food Microbiology 111, S93-S96.

**Grunenwald H, 2003.** *Optimization of polymerase chain reaction.* En: PCR protocols. Barlett JMS, Stirling D (Eds.). Humana Press, Nueva Jersey, EEUU. Págs. 89-100.

**Guzev L, Danshin A, Ziv S, Lichter A, 2006.** *Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel.* International Journal of Food Microbiology 111, S67-S71.

**Hall TA, 1999.** *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.* Nucleic Acids Symposium Series 41, 95-98.

**Hanna SE, Connor CJ, Wang HH, 2005.** *Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations.* Journal of Food Science 70, R49-R53.

**Hassen W, Abid-Essafi S, Achour A, Guezzah N, Zakhama A, Ellouz F, Creppy EE, Bacha H, 2004.** *Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of ochratoxin A and possible genetic predisposition.* Human and Experimental Toxicology 23, 339-346.

**Hawksworth D, Kirk P, Sutton B, Pegler D, 1996.** *Ainsworth's and Bisby's dictionary of the fungi.* CAB International, Wallingford, Reino Unido.

**Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996.** *Real time quantitative PCR.* Genome Research 6, 986-994.

**Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH, 2000.** *Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2.* Journal of Clinical Microbiology 38, 510-515.

**Hernández-Montiel LG, Ochoa JL, Troyo-Diéguez E, Larralde-Corona CP, 2010.** *Biocontrol of postharvest blue mold (Penicillium italicum Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus Debaryomyces hansenii isolates.* Postharvest Biology and Technology 56, 181-187.

**Herrera M, Herrera A, Ariño A, 2009.** *Estimation of dietary intake of ochratoxin A from liquorice confectionery.* Food and Chemical Toxicology 47, 2002-2006.

**Hinukson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DN, Morrison CJ, 2005.** *Assesment of ribosomal large subunit D1-D2, ITS1 and ITS2 regions as targets for molecular identification of medically important Aspergillus species.* Journal of Clinical Microbiology 43, 2092-2103.

- Hocking AD, Leong SL, Kazi BA, Emmet RW, Scott ES, 2007.** *Fungi and mycotoxins in vineyards and grape-products*. International Journal of Food Microbiology 119, 84-88.
- Hua SST, Baker JL, Flores-Espiritu M, 1999.** *Interaction of saprophytic yeast with a nor mutant of Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology 65, 2738-2740.
- Huff JE, 1991.** *Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals*. IARC Scientific Publications 115, 229-244.
- Huff WE, Hamilton PB, 1979.** *Mycotoxins – their biosynthesis in fungi: ochratoxins – metabolites of combined pathways*. Journal of Food Protection 42, 815-820.
- Huffman J, Gerber R, Du L, 2010.** *Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins*. Biopolymers 93, 764-776.
- Hussein HS, Brasei JM, 2001.** *Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology 167, 101-134.
- Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutier H, 2001.** *Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents*. Toxicology Letters 122, 179-188.
- Iamanaka BT, Taniwaki MH, Menezes HC, Vicente E, Fungaro MHP, 2005.** *Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil*. Food Additives and Contaminants 22, 1258-1263.
- IARC, 1993.** *Ochratoxin A*. En: Some naturally occurring substances: some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 56, 489-521.
- IUPAC, 1992.** *Ochratoxin A: a review*. Pure and Applied Chemistry 64, 1029-1046.
- Ignjatovic I, Markovic N, Stojkovic I, Èukuranovic R, Petrovic B, Kocic B, Stefanovic V, 2004.** *Balkan endemic nephropathy and associated urothelial tumors: A surgery based study from 1969 to 1998*. Archive of Oncology 12, 21-22.
- ISO, 1996a.** ISO 15141-1. *Productos alimenticios. Determinación de ocratoxina A. Parte 1: Método por cromatografía líquida de alta resolución para harina de trigo*.
- ISO, 1996b.** ISO 15141-2. *Productos alimenticios. Determinación de ocratoxina A. Parte 2: Método por cromatografía líquida de alta resolución para salvado de cebada, maíz y trigo*.
- Jaykus LA, 2003.** *Challenges to developing real-time methods to detect pathogens in foods*. AMS News 69, 341-347.
- JEFCA, 2001.** *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. FAO food and nutrition paper 74, 1-706.

- John ME, 1992.** *An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics.* Nucleic Acid Research 20, 2381.
- Kabak B, Dobson ADW, Var I, 2006.** *Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46, 593-619.
- Kabak B, 2009.** *Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: occurrence and exposure assessment.* Food and Chemical Toxicology 47, 348-352.
- Kabak B, Dobson ADW, 2009.** *Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins.* Journal of Food Protection 72, 2006-2016.
- Kapetanakou AE, Panagou E, Gialitaki M, Drosinos EH, Skandamis PN, 2009.** *Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by Aspergillus ochraceus and A. carbonarius on culture medium and Corinth raisins.* Food Control 20, 725-732.
- Karolewicz A, Geisen R, 2005.** *Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of Penicillium nordicum.* Systematic and Applied Microbiology 28, 588-595.
- Keller NP, Hohn T, 1997.** *Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi.* Fungal Genetics and Biology 21, 17-29.
- Kim CS, Lee CH, Shin JS, Chung YS, Hyung NI, 1997.** *A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP.* Nucleic Acid Research 25, 1085-1086.
- KIRIN, 2009.** *Kirin Institute of Food and Lifestyle Report Vol. 22. 2008 Beer Consumption in Major Countries.* [http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2009/1221\\_01.html](http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2009/1221_01.html)
- KIRIN, 2010.** *Kirin Institute of Food and Lifestyle Report Vol. 26. Global Beer Production by Country in 2009.* [http://www.kirinholdings.co.jp/English/news/2010/0810\\_01.html](http://www.kirinholdings.co.jp/English/news/2010/0810_01.html)
- Kraikruan W, Sangchote S, Sukprakarn S, 2008.** *Effect of capsaicin on germination of Colletotrichum capsici conidia.* Kasetsart Journal (Natural Science) 42, 417-422.
- Kristensen R, Gauthier G, Berdal KG, Hamels S, Remacle J, Holst-Jensen A, 2007.** *DNA microarray to detect and identify trichothecene- and moniliformin-producing Fusarium species.* Journal of Applied Microbiology 102, 1060-1070.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsoon M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N, 2006.** *The real-time polymerase chain reaction.* Molecular Aspects of Medicine 27, 95-125.
- Lai M, Semeniuk G, Hesseltine CW, 1970.** *Conditions for production of ochratoxin A by Aspergillus species in a synthetic medium.* Applied Microbiology 19, 542-544.

- Lasram S, Bellí N, Chebil S, Nahla Z, Ahmed M, Sanchis V, Ghorbel A, 2007.** *Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisia vineyard.* International Journal of Food Microbiology 114, 376-379.
- Leong SL, Hocking AD, Pitt JI, Kazi BA, Emmett RW, Scott ES, 2006.** *Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A.* International Journal of Food Microbiology 111, S10-S17.
- Leong SL, Hien LT, An NT, Trang NT, Hocking AD, Scott ES, 2007.** *Ochratoxin A-producing Aspergilli in Vietnamese green coffee beans.* Letters in Applied Microbiology 45, 301-306.
- Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, Nyamongo J, Backer L, Dahiye AM, Misore A, DeCock K, Rubin C, 2005.** *Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya.* Environmental Health Perspectives 113, 1763-1767.
- Lezar S, Barros E, 2010.** *Oligonucleotide microarray for the identification of potential mycotoxigenic fungi.* BMC Microbiology 10, 1-14.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J, 2000.** *Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR.* Journal of Clinical Microbiology 38, 471.
- Liu SQ, Tsao M, 2009.** *Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast Debaryomyces hansenii in yoghurt and cheese at elevated temperatures.* Food Control 20, 852-855.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001.** *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.* Methods 25, 402-408.
- López-Gresa MP, González MC, Primo J, Moya P, Romero V, Estornell E, 2005.** *Circumdatin H, a new inhibitor of mitochondrial NADH oxidase, from Aspergillus ochraceus.* The Journal of Antibiotics 58, 416-419.
- Losada L, Ajayi O, Frisvad JC, Yu J, Nierman WC, 2009.** *Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in Aspergillus species.* Medical Mycology 47, S88-S96.
- Lund F, Frisvad JC, 2003.** *Penicillium verrucosum in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A.* Journal of Applied Microbiology 95, 1117-1123.
- Mackay IM, Mackay JF, Nissen MD, Sloots TP, 2007.** *Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries.* En: Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. Mackay IM (Ed.). Horizon Scientific Press, Norfolk, Reino Unido. Págs. 1-40.



- Magan N, Sanchis V, Aldred D, 2004.** *Role of spoilage fungi in seed deterioration.* En: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications. Arora DK (Ed.). Marcell Dekker, Nueva York, EEUU. Págs. 311-323.
- Magan N, 2006.** *Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies.* Mycopathologia 162, 245-253.
- Magan N, Aldred D, 2007.** *Why do fungi produce mycotoxins?.* En: Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food. Dijksterhuis J (Ed.). CRC Press, Londres, Reino Unido . Págs. 121-133.
- Magnoli CE, Astoreca AL, Chiacchiera SM, Dalcero AM, 2007a.** *Ocurrence of Ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries.* Mycopathologia 163, 249-260.'
- Magnoli C, Astorteca A, Ponsone ML, Fernández-Juri MG, Barberis C, Dalcero AM, 2007b.** *Ochratoxin A and Aspergillus section Nigri in peanuts sedes at different months of storage in Córdoba, Argentina.* International Journal of Food Microbiology 119, 213-218.
- Mally A, Keim-Heusler H, Amberg A, Kurtz M, Zepnik H, Mantle P, Völkel W, Hard GC, Dekant W, 2005.** *Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats.* Toxicological and Applied Pharmacology 206, 43-53.
- Malvick DK, Grunden E, 2005.** *Isolation of fungal DNA from plants tissues and removal of DNA amplification inhibitors.* Molecular Ecology Notes 5, 958-960.
- Mantle PG, Chow AM, 2000.** *Ochratoxin formation in Aspergillus ochraceus with particular reference to spoilage of coffee.* International Journal of Food Microbiology 56, 105-109.
- Marino A, Nostro A, Fiorentino C, 2009.** *Ochratoxin A production by Aspergillus westerdijkiae in orange fruit and juice.* International Journal of Food Microbiology 132, 185-189.
- Marmur J, Doty P, 1962.** *Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature.* Journal of Molecular Biology 5, 109-118.
- Marquardt RR, Frohlich AA, 1992.** *A review of recent advances in understanding ochratoxicosis.* Journal of Animal Science 70, 3968-3988.
- Marquina D, Barroso J, Santos A, Peinado JM, 2001.** *Production and characteristics of Debaryomyces hansenii killer toxin.* Microbiological Research 156, 387-391.
- Marr JS, Maloy CD, 1996.** *An epidemiologic analysis of the ten plagues of the ten plagues of Egypt.* Caduceus 12, 7-24.

- Martínez-Culebras PV, Ramón D, 2007.** *An ITS-RFLP method to identify black Aspergillus isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine.* International Journal of Food Microbiology 113, 147-153.
- Masoud W, Kaltoft CH, 2006.** *The effects of yeast involved in the fermentation of Coffea arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by Aspergillus ochraceus.* International Journal of Food Microbiology 106, 229-234.
- Mateo R, Medina A, Mateo EM, Mateo F, Jiménez M, 2007.** *An overview of ochratoxin A in beer and wine.* International Journal of Food Microbiology 119, 79-83.
- Mayer Z, Bagnara A, Färber, Geisen R, 2003.** *Quantification of the copy number of nor-1, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of Aspergillus flavus in foods.* International Journal of Food Microbiology 82, 143-151.
- McGrath MT, 2009.** *Fungicides and other chemical approaches for use in plant disease control.* En: Encyclopedia of Microbiology. Schaechter M (Ed.). Academic Press, Oxford, Reino Unido. Págs. 412-421.
- Meca G, Blaiotta G, Ritieni A, 2010.** *Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato.* Food Control 21, 579-583.
- Medina A, Mateo R, Valie-Algarra FM, Mateo EM, Jiménez M, 2007.** *Effect of carbendazim and physiochemical factors on the growth and ochratoxin A production of Aspergillus carbonarius isolated from grapes.* International Journal of Food Microbiology 119, 230-235.
- Medina A, Mateo EM, Valle-Algarra FM, Mateo F, Mateo R, Jiménez M, 2008.** *Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of Aspergillus spp. isolated from grapes.* International Journal of Food Microbiology 122, 93-99.
- Miraglia M, Brera C, 2002.** *Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States.* Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7.
- Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E, Prillinger H, 2004.** *Trichosporon mycotoxinivorans sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins.* Systematic and Applied Microbiology 27, 661-671.
- Morello LG, Sartori D, De Oliveira Martinez AL, Vieira MLC, Taniwaki MH, Fungaro MHP, 2007.** *Detection and quantification of Aspergillus westerdijkiae in coffee beans based on selective amplification of  $\beta$ -tubulin gene by using real-time PCR.* International Journal of Food Microbiology 119, 270-276.

- Mühlencoert E, Mayer I, Zapf MW, Vogel RF, Niessen L, 2004.** *Production of ochratoxin A by Aspergillus ochraceus.* European Journal of Plant Pathology 110, 651-659.
- Mulè G, Susca A, Logrieco A, Stea G, Visconti A, 2006.** *Development of a real-time PCR assay for the detection of Aspergillus carbonarius in grapes.* International Journal of Food Microbiology 111, S28-S34.
- Nicholson P, Innes J, 2004.** *Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants.* En: Mycotoxins in food: detection and control. Magan N, Olsen M (Eds.). Woodhead Publishing, Oxford, Reino Unido. Págs. 111-136.
- Niessen L, Schmidt H, Mühlencoert E, Färber P, Karolewicz A, Geisen R, 2005.** *Advances in the molecular diagnosis of ochratoxin A-producing fungi.* Food Additives and Contaminants 22, 324-334.
- Niessen L, 2007.** *PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi.* International Journal of Food Microbiology 119, 38-46.
- Noonim P, Mahakarnchanakul W, Nielsen KF, Frisvad JC, Samson RA, 2008.** *Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing Aspergillus species from coffee beans grown in two regions of Thailand.* International Journal of Food Microbiology 128, 197-202.
- Núñez YP, Pueyo E, Carrascosa AV, Martínez-Rodríguez AJ, 2008.** *Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cells walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system.* Journal of Food Protection 71, 1496-1499.
- O'Brian GR, Fakhoury AM, Payne GA, 2003.** *Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus.* Fungal Genetics and Biology 39, 118-127.
- O'Callaghan J, Caddick MX, Dobson AD, 2003.** *A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in Aspergillus ochraceus.* Microbiology 149, 3485-3491.
- O'Callaghan J, Stapleton PC, Dobson AD, 2006.** *Ochratoxin A biosynthetic genes in Aspergillus ochraceus are differentially regulated by pH and nutritional stimuli.* Fungal Genetics and Biology 43, 213-221.
- Ortiz-Bermúdez P, Srebotnik E, Hammel KE, 2003.** *Chlorination and cleavage of lignin structures by fungal chloroperoxidases.* Applied and Environmental Microbiology 69, 5015-5018.
- Pal KK, Gardener BM, 2006.** *Biological control of plant pathogens.* En: The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHIA- 2006-1117-02.

- Palumbo JD, O’Keeffe TL, Mahoney NE, 2007.** *Inhibition of ochratoxin A production and growth of Aspergillus species by phenolic antioxidant compounds.* Mycopathologia 164, 241-248.
- Papachristou A, Markaki P, 2004.** *Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography.* Food Additives and Contaminants 21, 85-92.
- Pardo E, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, 2004.** *Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by Aspergillus ochraceus on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity.* International Journal of Food Microbiology 95, 79-88.
- Pardo E, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S, 2005.** *Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of Aspergillus ochraceus on a green coffee-based medium.* International Journal of Food Microbiology 98, 1-9.
- Pardo E, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V, 2006a.** *Ecophysiology of ochratoxigenic Aspergillus ochraceus and Penicillium verrucosum isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention – a review.* Food Additives and Contaminants 23, 398-410.
- Pardo E, Sanchis V, Ramos AJ, Marín S, 2006b.** *Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of Aspergillus ochraceus.* Food Microbiology 23, 351-358.
- Patiño B, González-Salgado A, González-Jaén MT, Vázquez C, 2005.** *PCR detection assays for the ochratoxin-producing Aspergillus carbonarius and Aspergillus ochraceus species.* International Journal of Food Microbiology 104, 207-214.
- Pena A, Cereiro F, Silva LJG, Lino CM, 2010.** *Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC-FD with direct injection.* Talanta 82, 1556-1561.
- Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M, 1999.** *Toxic effects of mycotoxins in humans.* Bulletin of the World Health Organization 77, 754-766.
- Perrone G, Susca A, Logrieco A, Stea G, Visconti A, 2004.** *PCR assay for identification of Aspergillus carbonarius and Aspergillus japonicus.* European Journal of Plant Pathology 110, 641-649.
- Petéri Z, Téren J, Vágvölgyi C, Varga J, 2007.** *Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts.* Food Microbiology 24, 205-210.
- Peterson SW, 2008.** *Phylogenetic analysis of Aspergillus species using DNA sequences from four loci.* Mycologia 100, 205-226.
- Petzinger E, Weindenbach A, 2002.** *Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins.* Livestock Production Science 76, 245-250.

- Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA, 2007.** *Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans.* Molecular Nutrition and Food Research 51, 61-99.
- Pietri A, Bertuzzi T, Gualla A, Piva G, 2006.** *Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from Northern Italy.* Italian Journal of Food Science 18, 99-106.
- Pietri A, Rastelli S, Bertuzzi T, 2010.** *Ochratoxin A and aflatoxins in liquorice products.* Toxins 2, 758-770.
- Pimenta RS, Morais PB, Rosa CA, Correa A, 2009.** *Utilization of yeast in biological control programs.* En: Yeast biotechnology: diversity and applications. Satyanarayana T, Kun G (Eds.). Springer, Berlín, Alemania.
- Pitout MJ, Nel W, 1969.** *The inhibitory effect of ochratoxin A on bovine carboxypeptidase A in vitro.* Biochemical Pharmacology 18, 1837-1843.
- Pitt JI, 1984.** *The significance of potentially toxigenic fungi in foods.* Food Technology 36, 218-219.
- Pitt JI, 1996.** *What are mycotoxins?.* Australian Mycotoxin Newsletter 7, 1.
- Pitt JI, 2000a.** *Toxigenic fungi and mycotoxins.* British Medical Bulletin 56, 184-192.
- Pitt JI, 2000b.** *Toxigenic fungi: which are important?.* Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology 38, 17-22.
- Queroi A, Barrio E, Huerta T, Ramón D, 1992.** *Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains.* Applied and Environmental Microbiology 58, 2948-2953.
- Rabaek L, Breinholt J, 1999.** *Circumdatins D, E and F: further benzodiazepine analogues from Aspergillus ochraceus.* Journal of Natural Products 62, 904-905.
- Rabaek L, Breinholt J, Frisvad JC, Christophersen C, 1999.** *Circumdatin A, B and C: three new benzodiazepine alkaloids isolated from a culture of the fungus Aspergillus ochraceus.* The Journal of Organic Chemistry 64, 1689-1692.
- Rached E, Hard GC, Blumbach K, Weber K, Draheim R, Lutz WK, Özden S, Steger U, Dekant W, Mally A, 2007.** *Ochratoxin A: 13-week oral toxicity and cell proliferation in male F344/N rats.* Toxicological Sciences 97, 288-298.
- Ramos AJ, Labernia N, Marín S, Sanchis V, Magan N, 1998.** *Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of Aspergillus ochraceus on a barley extract medium and on barley grains.* International Journal of Food Microbiology 44, 133-140.

**Raper KB, Fennell DI, 1965.** *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore, EEUU.

**RASFF, 2010.** *Annual Report 2009*. Publications Office of the European Union, Luxemburgo.

**Riba A, Mokrane S, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N, 2008.** *Mycoflora and ochratoxin A producing strains of Aspergillus in Algerian wheat*. International Journal of Food Microbiology 122, 85-92.

**Richard JL, 2007.** *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview*. International Journal of Food Microbiology 119, 3-10.

**Ringot D, Lerzy B, Bonhoure JP, Auclair E, Oriol E, Larondelle Y, 2005.** *Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives*. Process Biochemistry 40, 3008-3019.

**Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT, 1997.** *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the Polymerase Chain Reaction*. Analytical Biochemistry 245, 154-160.

**Romani S, Sacchetti G, Chaves López C, Pinnavaia GG, Dalia Rosa M, 2000.** *Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 3616-3619.

**Romani S, Pinnavaia GG, Dalla Rosa M, 2003.** *Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 5168-5171.

**Romero SM, Alberto MR, Manca de Nadra MC, Vaamonde G, 2009.** *Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in Aspergillus carbonarius by flavonoid and nonflavonoid compounds*. Mycotoxin Research 25, 165-170.

**Rosa CAR, Keller KM, Keller LAM, González Pereyra ML, Pereyra CM, Dalcero AM, Cavaglieri LR, Lopes CWG, 2009.** *Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil*. Toxicon 53, 283-288.

**Roussos S, Zaouia N, Salih G, Tantaoui-Elaraki A, Lamrani K, Cheheb M, Hassouni H, Verhé F, Perraud-Gaime I, Augur C, Ismaili-Alaoui M, 2006.** *Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: Toxinogenic potential of Aspergillus strains*. Molecular Nutrition and Food Research 50, 500-506.

**Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, 1988.** *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science 239, 487-491.

**Sambrook J, Russell DW, 2001.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EEUU.

- Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers FA, Frisvad JC, 2004.** *New ochratoxin A or sclerotium producing species in Aspergillus section Nigri*. *Studies in Mycology* 50, 45-61.
- Samson RA, Hong SB, Frisvad JC, 2006.** *Old and new concepts of species differentiation in Aspergillus*. *Medical Mycology* 44, S133-S148.
- Santos A, Marquina D, Barroso J, Peinado JM, 2002.** *(1-6)- $\beta$ -D-glucan as the cell wall binding site for Debaryomyces hansenii killer toxin*. *Letters in Applied Microbiology* 34, 95-99.
- Santos A, Marquina D, 2004.** *Killer toxin of Pichia membranifaciens and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine*. *Microbiology* 150, 2527-2534.
- Santos A, Sánchez A, Marquina D, 2004.** *Yeast as biological agents to control Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159, 331-338.
- Santos L, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, 2008.** *Capsicum and mycotoxin contamination: state of the art in a global context*. *Food Science and Technology International* 14, 5-20.
- Santos L, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, 2009.** *Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 1802-1807.
- Santos L, Kasper R, Gil-Serna J, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, 2010a.** *Effect of Capsicum carotenoids on growth and ochratoxin A production by chilli and paprika Aspergillus spp. isolates*. *International Journal of Food Microbiology* 142, 354-359.
- Santos L, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, 2010b.** *Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Capsicum poder samples available on the Spanish Market*. *Food Chemistry* 122, 826-830.
- Sartori D, Furlaneto MC, Martins MK, Ferreira de Paula MR, Pizzirani-Kleiner AA, Taniwaki MH, Fungaro MH, 2006.** *PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing Aspergillus species in coffee beans*. *Research in Microbiology* 157, 350-354.
- Sartori D, Taniwaki H, Iamanaka B, Fungaro MHP, 2010.** *Molecular diagnosis of ochratoxigenic fungi*. En: *Molecular identification of fungi*. Gherbawy Y, Voigt K (Eds.). Springer, Berlín, Alemania. Págs. 195-212.
- SCF, 1998.** *Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A (expressed on 17<sup>th</sup> September 1998)*. European Commission, Food Science and Techniques. Luxemburgo, Luxemburgo.

- Schilter B, Marin-Kuan M, Delatour T, Nestler S, Mantle P, Cavin C, 2005.** *Ochratoxin A: potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity.* Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment 22, 88-93.
- Schmidt H, Bannier M, Vogel RF, Niessen L, 2004.** *Detection and quantification of Aspergillus ochraceus in green coffee by PCR.* Letters in Applied Microbiology 38, 464-469.
- Schmidt-Heydt M, Geisen R, 2007.** *A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food.* International Journal of Food Microbiology 117, 131-140.
- Schmidt-Heydt M, Magan N, Geisen R, 2008a.** *Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors.* FEMS Microbiology Letters 284, 142-149.
- Schmidt-Heydt M, Richter W, Michulec M, Buttinger G, Geisen R, 2008b.** *Comprehensive molecular system to study the presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of Penicillium verrucosum in wheat.* Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 25, 193-202.
- Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, Geisen R, 2009.** *Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of Aspergillus flavus in relation to various combinations of water activity and temperature.* International Journal of Food Microbiology 135, 231-237.
- Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N, 2011.** *Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two Fusarium species.* Journal of the Royal Society Interface 8, 117-126.
- Schmittgen TD, Livak KJ, 2008.** *Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method.* Nature Protocols 3, 1101 – 1108.
- Scudamore KA, 2004.** Control of mycotoxins: secondary processing. En: Mycotoxins in food: detection and control. Magan N, Olsen M (Eds.). Woodhead Publising, Oxford, Reino Unido. Págs. 224-243.
- Selma MV, Martínez-Culebras PV, Aznar R, 2008.** *Real-time PCR based procedures for detection and quantification of Aspergillus carbonarius in wine grapes.* International Journal of Food Microbiology 122, 126-134.
- Serra J, 2004.** *Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 6347-6352.
- Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venâncio A, 2003.** *Black Aspergillus species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes.* International Journal of Food Microbiology 88, 63-68.



- Shaoguang L, Dongguang L, 2008.** *DNA microarray technology*. En: DNA microarray technology and data analysis in cancer research. Shaoguang L, Dongguang L (Eds.). World Scientific, Singapur, Singapur. Págs. 1-10.
- Shetty PH, Jespersen L, 2006.** *Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents*. Trends in Food Science and Technology 17, 48-55.
- Shotwell OL, Hesseltine CW, Goulden ML, 1969.** *Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample*. Applied Microbiology 17, 765-766.
- Shundo L, de Aimeida AP, Aiaburda J, Lamardo LCA, Navas SA, Ruvieri V, Sabino M, 2009.** *Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika*. Food Control 20, 1099-1102.
- Skaug MA, 1999.** *Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A*. Food Additives and Contaminants 16, 75-78.
- Soliman KM, Badeaa RI, 2002.** *Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi*. Food and Chemical Toxicology 40, 1669-1675.
- Sonjak S, Licen M, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N, 2011.** *The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia*. Food Microbiology 28, 373-376.
- Soriano JM, 2007.** *Las micotoxinas en la historia*. En: Micotoxinas en alimentos. Soriano JM (Ed.). Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España. Págs. 4-14.
- Spadaro D, Gullino ML, 2004.** *State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases*. International Journal of Food Microbiology 91, 185-194.
- Spadaro D, Patharajan S, Kartikeyan M, Lorè A, Garibaldi A, Gullino ML, 2010.** *Specific PCR primers for the detection of isolates of Aspergillus carbonarius producing ochratoxin A on grapevine*. Annals of Microbiology, en prensa.
- Speijers GJA, Van Egmond HP, 1993.** *Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds*. En: Human ochratoxicosis and its pathologies. Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G (Eds.). John Libbey Eurotext, Montrouge, Francia. Págs. 85-100.
- Stack ME, Misiivec PB, 1978.** *Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of Aspergillus ochraceus, Penicillium cyclopium and Penicillium viridicatum*. Applied and Environmental Microbiology 36, 552-554.
- Stack ME, Mislivec PB, Denizel T, Gibson R, Pohland AE, 1983.** *Ochratoxins A and B, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin production by isolates of Aspergillus ochraceus from green coffee beans*. Journal of Food Protection 46, 965-968.

- Stander MA, Bornscheuer UT, Henke E, Steyn PS, 2000.** *Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 5736–5739.
- Steyn PS, 1995.** *Mycotoxins, general view, chemistry and structure.* Toxicology Letters 82/83, 843-851.
- Stoev SD, 1998.** *The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation.* Veterinary and Human Toxicology 40, 352-360.
- Studer-Rohr I, Dietrich DR, Schlatter J, Schlatter C, 1995.** *The occurrence of ochratoxin A in coffee.* Food and Chemical Toxicology 33, 341-355.
- Suarez MB, Walsh K, Boonham N, O'Neill T, Pearson S, Baker I, 2005.** *Development of a real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of Botrytis cinerea in planta.* Plant Physiology and Biochemistry 43, 890-899.
- Suárez-Quiroz ML, González-Ríos O, Guyot B, Schorr-Galindo S, Guiraud JP, 2004.** *Effect of chemical and environmental factors on Aspergillus ochraceus growth and toxigenesis in green coffee.* Food Microbiology 21, 629-634.
- Susca A, Stea G, Mulè G, Perrone G, 2007.** *Polymerase chain reaction (PCR) identification of Aspergillus niger and Aspergillus tubingensis based on calmodulin gene.* Food Additives and Contaminants 24, 1154-1160.
- Tafari A, Ferracane R, Ritieni A, 2004.** *Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products.* Food Chemistry 88, 487-494.
- Taniwaki MH, Pitt JJ, Teixeira AA, Iamanaka BT, 2003.** *The source of Ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods.* International Journal of Food Microbiology 82, 173-179.
- Tatu CA, Orem WH, Finkelman R, Feder GL, 1998.** *The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers.* Environmental Health Perspectives 106, 689-700.
- Tewksbury JJ, Reagan KM, Machnicki NJ, Carlo TA, Haak DC, Calderón AL, Levey DJ, 2008.** *Evolutionary ecology of pungency in wild chillies.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 11808-11811.
- Thirumala-Devi K, Mayo MA, Reddy G, Tangni EK, Larondelle Y, Reddy DV, 2001.** *Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India.* Food Additives and Contaminants 18, 830-835.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994.** *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acid Research 22, 4673-4680.

- Tuthill DE, Christensen M, 1986.** *Aspergillus sepultus, a new species in the Aspergillus ochraceus group.* Mycologia 3, 475-477.
- Urbano GR, Taniwaki MH, Leitão MFF, Vicentini MC, 2001.** *Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee.* Journal of Food Protection 64, 1226-1230.
- Urbano GR, Leitão MFF, Vicentini MC, Taniwaki MH, 2004.** *Preliminary studies on the destruction of ochratoxin A in coffee during roasting.* Food Science and Technology International 10, 45-49.
- Valero A, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V, 2008.** *Survey: ochratoxin A in European special wines.* Food Chemistry 108, 593-599.
- Valle-Algarra FM, Mateo R, Medina A, Mateo F, Mateo EM, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M, 2009.** *Effect of the baking process on the reduction of ochratoxin A in wheat flour.* En: Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products. Méndez-Vilas A (Ed.). World Scientific Publishing, Singapur, Singapur. Págs. 382-385.
- Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, 1965.** *Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh.* Nature 205, 1112-1113.
- Van der Stegen GH, Essens PJ, van der Lijn J, 2001.** *Effect of roasting conditions on reduction of ochratoxin A in coffee.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 4713-4715.
- Van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA, 2007.** *Regulations relating to mycotoxins in food. Perspectives in a global and European context.* Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 147-157.
- Van Walbeek W, Scott PM, Harving J, Lawrence JW, 1969.** *Penicillium viridicatum Westling: a new source of ochratoxin A.* Canadian Journal of Food Microbiology 15, 1281-1285.
- Var I, Kabak B, Erginkaya Z, 2008.** *Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite.* Food Control 19, 592-598.
- Var I, Erginkaya Z, Kabak B, 2009.** *Reduction of ochratoxin A levels in white wine by yeast treatments.* Journal of the Institute of Brewing 115, 30-34.
- Varga J, Kevei E, Rinyu E, Téren J, Kozakiewicz Z, 1996.** *Ochratoxin production by Aspergillus species.* Applied and Environmental Microbiology 62, 4461-4464.
- Varga J, Rígó K, Téren J, 2000.** *Degradation of ochratoxin A by Aspergillus species.* International Journal of Food Microbiology 59, 1-7.

- Varga J, Rigó K, Téren J, Mesterházy A, 2001.** *Recent advances in ochratoxin research. Production, detection and occurrence of ochratoxins.* Cereal Research Communications 29, 85-100.
- Varga J, Péteri Z, Tábori K, Téren J, Vágvolgyi C, 2005.** *Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by Rhizopus isolates.* International Journal of Food Microbiology 99, 321-328.
- Varga J, Tóth B, 2005.** *Novel strategies to control mycotoxins in feed: a review.* Acta Veterinaria Hungarica 53, 189-203.
- Varga J, Kozakiewicz Z, 2006.** *Ochratoxin A in grapes and grape-derived products.* Trends in Food Science and Technology 17, 72-81.
- Varga J, Kocsubé S, Péteri Z, Vágvolgyi C, Tóth B, 2010.** *Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals.* Toxins 2, 1718-1750.
- Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR, 2005.** *Specific types of PCR assays.* En: Molecular Diagnostic PCR Handbook. Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR (Eds.). Springer, Berlín, Alemania. Págs. 74-100.
- Villa P, Markaki P, 2009.** *Aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: occurrence and risk assessment.* Food Control 20, 445-461.
- Viñas I, Usall J, Teixidó N, Sanchis V, 1998.** *Biological control of major postharvest pathogens on apple with Candida sake.* International Journal of Food Microbiology 40, 9-16.
- Visconti A, Perrone G, Cozzi G, Solfrizzo M, 2008.** *Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain.* Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 25, 193-202.
- Wagacha JM, Muthomi JW, 2008.** *Mycotoxins problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies.* International Journal of Food Microbiology 124, 1-12.
- Walker GM, McLeod AH, Hodgson VJ, 1995.** *Interactions between killer yeast and pathogenic fungi.* FEMS Microbiology Letters 127, 213-222.
- Walker R, Larsen JC, 2005.** *Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising.* Food Additives & Contaminants Supplement 1, 6-9.
- Werck-Reichardt D, Feyereisen R, 2000.** *Cytochromes p450: a success story.* Genome Biology 1, 1-9.

- White TJ, Burns T, Lee S, Taylor JW, 1990.** *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. En: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelgard DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). Academic Press, Nueva York, EEUU. Págs. 315-322.
- Wickerham LJ, 1951.** *Taxonomy of yeast*. US Department of Agriculture Technical Bulletin 1029, 1-56.
- Wilhelm J, Pingoud A, 2003.** *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. Chembiochem 4, 1120-1128.
- Wilson CL, Wisniewski ME, 1989.** *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology*. Annual Review of Phytopathology 27, 425-441.
- Wilson CL, 1997.** *Biological control and plant diseases – a new paradigm*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19, 158-159.
- Wilson IG, 1997.** *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*. Applied and Environmental Microbiology 63, 3741-3751.
- Xiao H, Srinivasa M, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich AA, Kemppainen BW, 1996.** *Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form, and several of its analogs: structure-activity relationships*. Toxicology and Applied Pharmacology 137, 182-192.
- Yiannikouris A, André G, Poughon L, François J, Dussap CG, Jeminet G, Bertin G, Jouany JP, 2006.** *Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with  $\beta$ -D-glucans*. Biomolecules 7, 1147-1155.
- Young C, McMillan L, Telfer E, Scott B, 2001.** *Molecular cloning and genetic analysis of an indole-diterpene gene cluster from *Penicillium paxilli**. Molecular Microbiology 39, 754-764.
- Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW, 2004.** *Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis*. Applied and Environmental Microbiology 70, 1253-1262.
- Zahavi T, Cohen L, Weiss B, Schena L, Daus A, Kaplunov T, Zutkhi J, Ben-Arie R, Droby S, 2000.** *Biological control of Botrytis, Aspergillus and Rhizopus rots on table and wine grapes in Israel*. Postharvest Biology and Technology 20, 115-124.
- Zaied C, Abid S, Zorgui L, Bouaziz C, Chouchane S, Jomaa M, Bacha H, 2009.** *Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals*. Food Control 20, 218-222.
- Zaied C, Bouaziz C, Azizi I, Bensassi F, Chour A, Bacha H, Abid S, 2010.** *Presence of ochratoxin A in Tunisian blood nephropathy patients. Exposure level to OTA*. Experimental and toxicologic pathology, en prensa.

- Zain ME, 2010.** *Impact of mycotoxins on humans and animals.* Journal of Saudi Chemical Society 15, 129-144.
- Zanzotto A, Burruano S, Marciano P, 2006.** *Digestion of DNA regions to discriminate ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains in the Aspergillus niger aggregate.* International Journal of Food Microbiology 110, 155-159.
- Zhou G, Whong WZ, Ong T, Chen B, 2000.** *Development of a fungus specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment.* Molecular and Cellular Probes 14, 339-348.
- Zhou T, Yu H, Errampali D, 2007.** *Strategies for biological control of fungal diseases of temperate fruits.* En: Biological control of plant diseases. Chincholkar SB, Mukerji KG (Eds.). Haworth Press, Nueva York, EEUU. Págs. 239-277.
- Zimmerli B, Dick R, 1996.** *Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment.* Food Additives and Contaminants 13, 655-668.
- Zinedine A, Juan C, Idrissi L, Mañes J, 2007.** *Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco.* Microchemical Journal 87, 154-158.
- Zinedine A, 2010.** *Ochratoxin A in Moroccan foods: occurrence and legislation.* Toxins 2, 1121-1133.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzhum F, 2004.** *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.* Nucleic Acid Research 32, e103.
- Zotti M, Montemartini Corte A, 2002.** *Aspergillus persii: a new species in Circumdati section.* Mycotaxon 83, 269-278.